

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Expresión testicular de ciclina A1 (CCNA1) en alpacas
(Lama pacos)**

TESIS

Para optar el grado de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

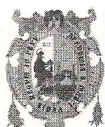
Luis Alberto Tataje Lavanda

ASESOR

Martha E. Valdivia Cuya

Lima – Perú

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 099-UPG-FCB-2012

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 11:48 horas del día 15.3.2013 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Mg.	Carmen A. Pantigoso Flores	e integrado por
Mg.	Fernando O. Retuerto Prieto	(Miembro)
Mg.	Dan E. Vivas Ruíz	(Miembro)
Mg.	Gustavo A. Sandoval Peña	(Miembro)
Mg.	Martha E. Valdivia Cuya	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **LUIS ALBERTO TATAJE LAVANDA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 099-UPG-FCB-12, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"Expresión testicular de ciclina A1 (*CCNA1*) en alpacas (*Lama pacos*)", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS




UNIDAD DE POSGRADO

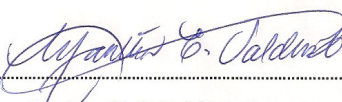
Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: Muy bueno con la nota de 18

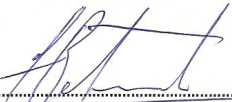
A continuación el Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magister en Biología Molecular al Bachiller Luis Alberto Tataje Lavanda

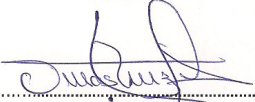
Siendo las 13:00 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.


Se extiende la presente Acta en Lima, a los 15 días del mes de marzo del año 2013.


Mg. Carmen A. Pantigoso Flores
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE


Mg. Martha E. Valdivia Cuya
Profesora Principal a D.E.
ASESORA


Mg. Fernando O. Retuerto Prieto
Profesor Principal a D.E.
MIEMBRO


Mg. Dan E. Vivas Ruíz
Profesor Auxiliar T.C. 40 horas
MIEMBRO


Mg. Gustavo A. Sandoval Peña
Profesor Auxiliar T.C. 40 horas
MIEMBRO

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento:

A mi querida profesora la Mg. Martha Valdivia Cuya por su amable disposición en la asesoría del presente trabajo y por permitir el uso del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal (LFRA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

A todos mis compañeros y amigos del LFRA, en especial a Alejandro Florentini, Jonathan Vásquez, Nadia Canorio, Evelyn Llerena y a los demás por haberme ayudado en todo momento.

Al Mg. Luis Guzmán por su apoyo y asesoría durante la estandarización de técnicas moleculares a través del Instituto Peruano de Biología Molecular (IPBM). Al Dr. Mirko Zimic por su guía en los análisis estadísticos y a Nora Vernimmen por su colaboración en la traducción del Resumen.

Además agradecer a los fondos PROCOM financiados por el Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), especialmente por el financiamiento del proyecto titulado “Búsqueda de marcadores diagnóstico de fertilidad en alpacas macho”, lo cual permitió mi participación como Co-investigador y facilitó la culminación del presente trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a esa gran energía divina llamada Dios que nos llena, y nos muestra el camino a seguir a cada instante.

A mis padres Dr. Alberto Tataje y Carolina Lavanda, por haberme guiado con amor y dedicación.

A mi mamá Elsa Espinoza (mi abuelita) y hermanos por estar allí cuando los necesité.

A mi tío Ing. Guillermo Lavanda por su ayuda y constante cooperación.

CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Contenido	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Glosario	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. La espermatogénesis.....	3
2.2. Genes y espermatogénesis en alpacas.....	5
2.3. El ciclo celular y las ciclinas.....	5
2.4. La ciclina A1 (<i>CCNA1</i>).....	7
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3.1. Hipótesis.....	11
3.2. Objetivo general.....	11
3.3. Objetivos específicos.....	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. Muestreo.....	12
4.2. Evaluación espermática.....	15
4.2.1. La concentración espermática	16

4.2.2. Movilidad progresiva total.....	16
4.2.3. Prueba de viabilidad.....	17
4.2.4. Integridad de membrana (Prueba de HOS).....	17
4.3. Diseños de cebadores	18
4.4. Aislamiento, purificación y cuantificación del RNA total.....	27
4.5. Tratamiento con DNasas y síntesis de cDNA	28
4.6. Optimización de cebadores	28
4.7. Secuenciamiento y alineamiento local.....	30
4.8. RT-qPCR.	31
4.9. Análisis estadístico	34
5. RESULTADOS	36
5.1. Resultados fisiológicos.	36
5.2. Resultado del secuenciamiento y análisis <i>in silico</i> de productos de PCR.....	37
5.3. Análisis estadísticos.....	42
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIONES	56
8. RECOMENDACIONES.....	56
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
10. ANEXOS.....	65

RESUMEN

La alpaca (*Lama pacos*) constituye el principal medio de subsistencia para un vasto sector de la población alto andina en países como Argentina, Chile, Ecuador, Bolivia y Perú, a través del comercio de su fibra, carne, energía de trabajo y otros derivados. En la mayoría de los casos la crianza de alpaca carece de innovaciones tecnológicas y sigue siendo de tipo tradicional, por lo cual enfrenta problemas de diversa índole sobresaliendo la mortalidad de las crías y las bajas tasas de natalidad debido a la mortalidad embrionaria. Todo esto no permite una adecuada selección de machos reproductores y resulta en un gran problema para el productor alpaquero.

En el presente estudio, se evaluó a la ciclina A1 (*CCNA1*) cuya expresión ha sido reportada casi exclusivamente en testículos de otros animales incluyendo el hombre y se le atribuye una función crítica en el control del ciclo celular durante la espermatogénesis. Se evaluó la expresión del mRNA de *CCNA1*, mediante RT-qPCR, en testículos de alpacas provenientes del Camal Municipal de Huancavelica en edad fértil (n = 35). Estos resultados fueron correlacionados con parámetros fisiológicos evaluados *in vitro*.

Se encontró expresión de mRNA de *CCNA1* en testículos de alpacas con regiones conservadas a nivel nucleotídico. A diferencia de lo que sucede en humanos y otros animales, el mRNA de *CCNA1* mostró una baja, pero significativa asociación, con la concentración espermática ($p < 0.05$).

Palabras clave: alpaca, *CCNA1*, espermatogénesis, fertilidad, testículo.

ABSTRACT

The alpaca (*Lama pacos*) is the main source of income for a major part of the high Andean population in countries like: Argentina, Chile, Ecuador, Bolivia and Peru. This is done through commerce of fiber (valued worldwide), meat, labor work and other derived products. Generally speaking, the alpaca's traditional breeding habit is caused by lack of technological innovation during their growth. For this reason, there are several problems due to embryonic mortality as pup mortality and a low birth rate. This does not allow a suitable selection of breeding male alpacas which is a serious problem for the alpaca breeder.

In the present study, the expression of the cyclin A1 (*CCNA1*) is evaluated, it is a gene which was shown to be expressed almost exclusively in humans and others animals' testis. This gene was detected by using RT-qPCR, and the expression of *CCNA1* was measured in sexually mature alpaca testis from “Camal Municipal de Huancavelica” (n = 35). These results were correlated with physiological parameters which in turn were evaluated *in vitro*.

In testes of alpacas was found *CCNA1* mRNA expression with conserved nucleotide sequence of highly conserved region. In contrast to others animals, *CCNA1* mRNA showed significant but low association with sperm concentration ($p < 0.05$).

Key words: alpaca, *CCNA1*, spermatogenesis, fertility, testis.

GLOSARIO

A₂₆₀	Absorbancia a 260nm
A₂₈₀	Absorbancia a 280nm
DNA	Deoxyribonucleic acid
cDNA	Complementary DNA
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	Messenger RNA
<i>CCNA1</i>	ciclina A1
Cdks	Cyclin-dependent kinases
cm³	centímetros cúbicos
CSA	Camélidos sudamericanos
E-E-jn	Exon-Exon junctions
g	gramos
IPBM	Instituto Peruano de Biología Molecular
IVF	<i>in vitro</i> fertilization
kg	Kilogramos
km	Kilómetros
m²	Metros cuadrados
MPF	Mitosis-promoting factor or M-Phase-promoting factor
ml	Mililitro
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
nm	Nanómetros
NTC	No template control
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RT-qPCR	Real-time quantitative reverse transcriptase
UTR	Untranslated region
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería de los camélidos sudamericanos (CSA) constituye una de las actividades productivas y económicas más importante de la zona altoandina (Ministerio de Agricultura del Perú, 2008). En Sur América se encuentran más del 90% de alpacas (Figura 01), de las cuales unos 3.06 millones se encuentran en el Perú (Brown, 2000) (Tabla 01). En las zonas altas del Perú, hogar de más de 1,000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno (Figura 02); donde la agricultura y ganadería común no son viables, la crianza de CSA constituye el único medio de subsistencia de las familias campesinas (CONACS, 2007), además de otras que se benefician indirectamente de ella (Ministerio de Economía del Perú, 2004). La crianza de CSA les representa del 70 al 80% del ingreso familiar anual (Ministerio de Agricultura del Perú, 2008) y son usadas principalmente por su fibra, sin embargo cobran importancia socio-económica por el aprovechamiento de su carne y productos derivados como el cuero (Escobar, 1984; Sumar, 1983) (Tabla 02).

Las alpacas (*Lama pacos*) (Rodríguez *et al.*, 2004) son rumiantes que pertenecen a la familia de los camélidos, del orden artiodáctilo (Figura 03). Existen dos variedades o razas de alpaca, que reciben nombres de Huacaya y Suri (Figura 04). Se estima que el tipo Huacaya constituye cerca del 90% de la alpaca producida. Normalmente, hay tipos intermedios debido al cruzamiento, dado que ambas variedades se hallan por lo general en un mismo rebaño (FAO, 1981). Tiene una vida productiva de aproximadamente 14 años, quedando aptos a partir de los dos o tres años con capacidad reproductiva y solo pueden ser usados para copular con hembras entre los meses de Diciembre a Marzo (FAO, 1977), la gestación dura once meses y medio produciendo una cría al año (Novoa, 1970).

Otro factor limitante en el desarrollo de la crianza de alpacas, es en la baja fertilidad con un porcentaje de preñez que va entre 40 – 60 % (Brown, 2000). Se estima que el 50% de la pérdida embrionaria ocurre durante el primer mes de embarazo por causas aún desconocidas (Fernández-Baca *et al.*, 1970b, 1970c; Quispe, 1996). Esto podría deberse debido a la pobre calidad de semen en comparación con otras especies domésticas (Flores *et al.*, 2002).

En los machos, la evaluación de las características seminales es uno de los métodos más simples de determinación indirecta de la fertilidad (Ax *et al.*, 2000). Sin embargo los CSA presentan características exclusivas en cuanto a su reproducción los hacen especies *sui generis*, por lo cual es necesario el uso de diversas técnicas de colección de semen (Pacheco y Joel, 2008). No obstante, no todos los ejemplares machos responden de forma eficiente a las diversas técnicas mencionadas debido a que los eyaculados obtenidos tienen baja concentración, baja movilidad, baja viabilidad y alto porcentaje de espermatozoides anormales en comparación con otras especies.

Para optimizar la eficiencia reproductiva de la alpaca, es necesario conocer los parámetros de diagnóstico molecular y así discriminar de manera objetiva al ejemplar con una alta capacidad fecundante para ser usado como semental. Por ello es necesario establecer correlaciones entre características reproductivas y genéticas como la concentración espermática con la expresión génica de la ciclina A1 (*CCNA1*) y otros conjuntos de genes, para ayudarnos a establecer parámetros apropiados para la selección de machos reproductores.

Es indiscutible la gran importancia económica de los camélidos sudamericanos, y en especial de las alpacas, para nuestros pobladores peruanos alto-andinos; por tanto, los estudios enfocados a encontrar potenciales marcadores de fertilidad y los estudios enfocados en la fisiología molecular reproductiva están completamente justificados y la información científica que se desprende de estas investigaciones será la base del desarrollo de programas nacionales de mejoramiento genético de los CSA.

2. ANTECEDENTES

A la fecha no han sido estudiados muchos aspectos básicos de la fisiología reproductiva de los CSA, en especial en machos (Fernández-Baca, 1993). Sin embargo, existen numerosas investigaciones realizadas en humanos y otros animales, de las cuales se extrae un consenso general sobre la espermatogénesis y sus mecanismos moleculares.

2.1. La espermatogénesis.

La progresión de la espermatogénesis en mamíferos requiere un balance preciso entre la actividad del ciclo celular y la eliminación de las células gaméticas defectuosas para asegurar la continuidad de la especie.

La espermatogénesis (Figura 05) empieza con las espermatogónias que se encuentran en los túbulos seminíferos, en el interior de los testículos formando parte de la población de células troncales que dará origen a los gametos haploides por medio de divisiones meióticas (Blanco-Rodríguez, 2006; Kierszenbaum, 2006), con posteriores modificaciones nucleares y citoplasmáticas que convertirán una célula esférica y diploide ($74+XY$ en alpacas) en cuatro células haploides flageladas ($37+X$ o $37+Y$ en alpacas), restableciendo de esta manera el número diploide característico de la progenie de la especie al unirse el espermatozoide con el ovulo (Di Berardino *et al.*, 2006)

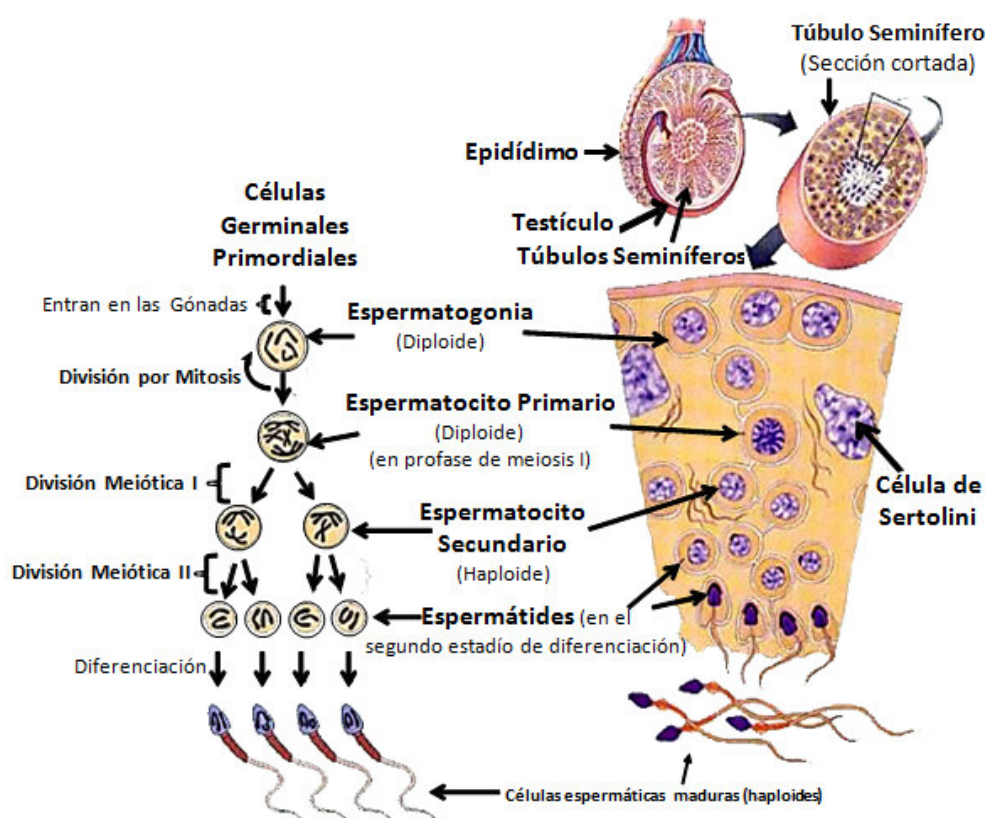


Figura 05. Esquema de las etapas de la espermatogénesis. Fuente: Imagen modificada de <http://biologian2012.blogspot.com/2012/07/testiculos-y-esperamtozoides.html>

En la alpaca la espermatogénesis comienza alrededor de los 10 a 12 meses siendo habitual a los dos años en adelante, el crecimiento testicular desacelera alcanzando un máximo a los tres años de edad, sin embargo se pueden encontrar machos fértiles desde seis meses de edad (Smith *et al.*, 1994). Se considera un macho fértil cuando presenta tamaño testicular de 4 a 5 cm de largo y de 2.5 a 3 cm de ancho (Galloway, 2000). En general, la calidad espermática puede verse afectada por la edad o por alteraciones a distintos niveles de la espermatogénesis que conllevan a las anomalías cromosómicas presentando en cigotos que no progresan en el desarrollo embrionario.

2.2. Genes y espermatogénesis en alpacas

Aún falta por develar los mecanismos y moléculas que participan en la espermatogénesis en alpacas y si estas se han mantenido a través de la evolución en los mamíferos.

Desde principios de los años noventa se han empezado a identificar genes que intervienen en la regulación de algunos de los pasos críticos de la espermatogénesis, entre ellos existen tres categorías de genes funcionales en la regulación de la espermatogénesis: El primer grupo incluye genes que se expresan específicamente en la línea germinal. El segundo grupo abarca genes esenciales para el desarrollo de las gónadas, cuya alteración produce secundariamente defectos de la Espermatogénesis. El tercer grupo es el de aquellos genes que tienen funciones conocidas en los tejidos somáticos y además en la línea germinal. Otros genes candidatos para explicar anomalías de espermatogénesis pertenecen a la familia de las ciclinas, que intervienen en la regulación del ciclo celular (Bassa, 2001).

2.3. El ciclo celular y las ciclinas

Los continuos ciclos celulares son coordinados y controlados por la acción en conjunto de proteínas llamadas “Quinasas dependientes de ciclina” (Cdks) y una familia heterogénea de proteínas llamadas “ciclinas” (proteínas citosólicas). Estas proteínas regulan fielmente la progresión del ciclo celular para asegurar una proliferación controlada (Bloom y Cross, 2007).

Las ciclinas están involucradas en la regulación del ciclo celular, activando la especificidad de las Cdks al unírseles, siendo regulada por síntesis y degradación proteica (Bloom y Cross, 2007). Recientes estudios en diversos organismos modelos (levaduras, anfibios, insectos, mamíferos, plantas), han mostrado que tales mecanismos se encuentran altamente conservados en la naturaleza y por lo tanto también sus componentes proteicos, tal como las ciclinas (Nieduszynski *et al.*, 2002) y

Cdks (Liu J y Kipreos, 2000) que son proteínas importantes en la regulación de la mitosis y la meiosis (Wolgemuth *et al.*, 2004), sintetizadas a partir de protooncogenes y trabajan en cooperación para regular el ciclo positivamente fosforilando serinas y treoninas de proteínas diana, para desencadenar procesos celulares controlando así, la progresión del ciclo celular eucariota (Figura 06).

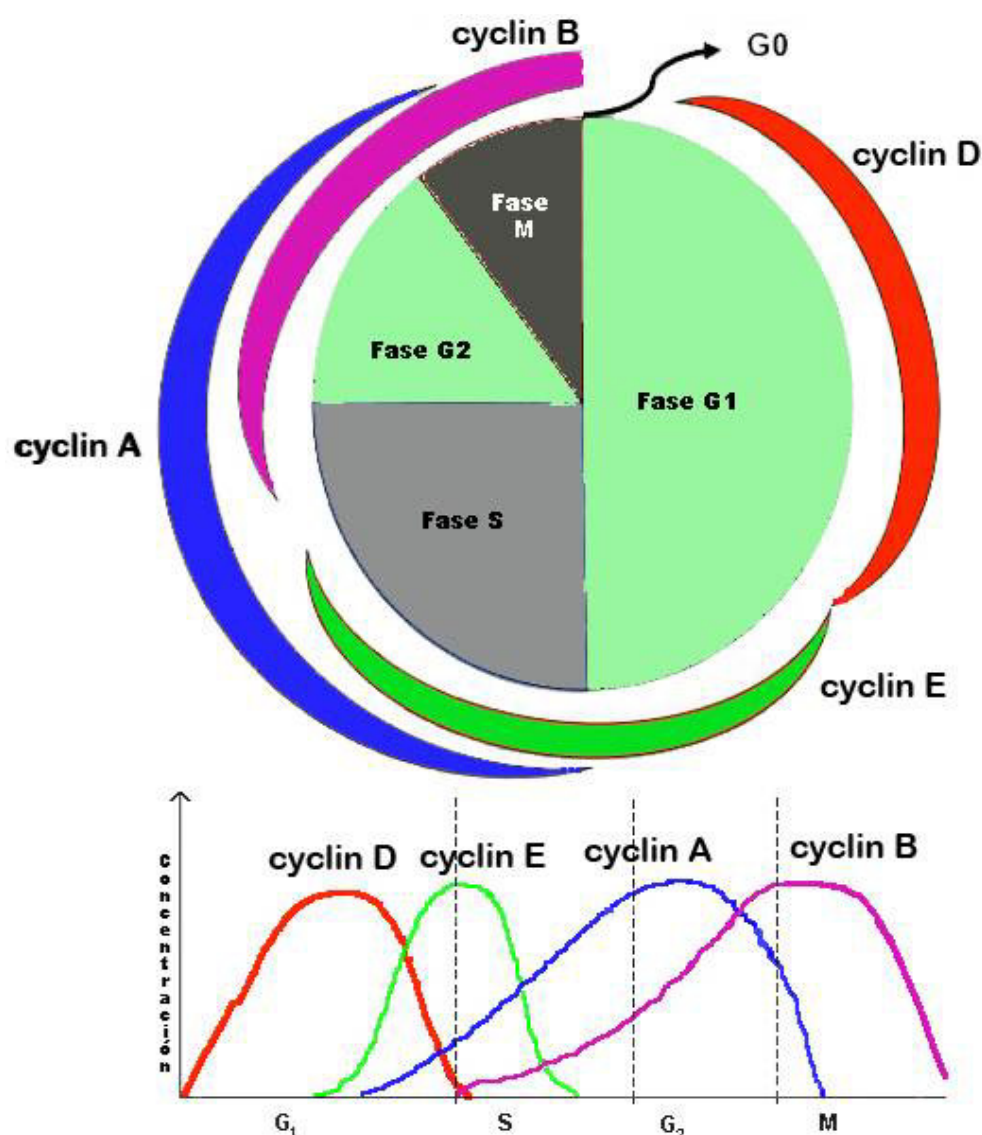


Figura 06. Expresión de diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular. Representación de los momentos de mayor expresión de las principales ciclinas a lo largo de la fase G₁, fase de síntesis (S), fase G₂ y la Mitosis (M). En color rojo se muestra la expresión de la ciclina D, en color verde la expresión de la ciclina E, en color azul la expresión de la ciclina A y en lila la expresión de la ciclina D. Fuente: Imágenes modificadas de http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=2010_Lecture_15 ; http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclin-dependent_kinase_complex

2.4. La ciclina A1 (*CCNA1*)

Al principio se identificó la “ciclina A2”, que es expresada en casi todos los tejidos adultos, pero no en los estadios meioticos de los testículos. Ésta ciclina participa (*in vitro*) durante las fases G1-S y G2-M. Se une y activa a las quinasas Cdk1 y Csk2 (Sweeney *et al.*, 1996; Ravník y Wolgemuth, 1999; Wolgemuth *et al.*, 2004).

Hace varios años se identificó un nuevo gen, la ciclina A1 en mamífero y existen reportes sobre su actividad involucrada en la producción de espermatozoides. La expresión de este gen se intensifica en individuos machos con elevada producción espermática y es casi imperceptible en individuos infértiles (Yang *et al.*, 1997; Nieduszynski *et al.*, 2002).

En testículos adultos de ratón la expresión de *CCNA1* se encontró restringida a espermatoцитos del paquiteno tardío y a los espermatoцитos diploténicos, mientras ciclina A2 es expresada en espermatoгонias y espermatoцитos pre-leptoténicos (Ravník y Wolgemuth, *et al.*, 1999).

En humanos el gen de la *CCNA1* está localizado en el cromosoma 13q12.3-q13 (Yang *et al.*, 1997) y está compuesto por 9 exones y 8 intrones que se forman alrededor de unos 13 kb (Figura 07). Su mRNA tiene alrededor de 2.1kb; codificante desde la posición 130 al 1,527 pb (Yang *et al.*, 1997). El promotor de la *CCNA1* no posee caja TATA, mientras que la región orientada hacia el extremo 5' de la región de inicio transcripcional contiene 4 cajas GC, con múltiples sitios de unión a Sp1 (factor de transcripción humano implicado en la expresión génica que tiene lugar durante el desarrollo temprano de un organismo), importantes en la regulación de la expresión de la *CCNA1* (Müller *et al.*, 1999).

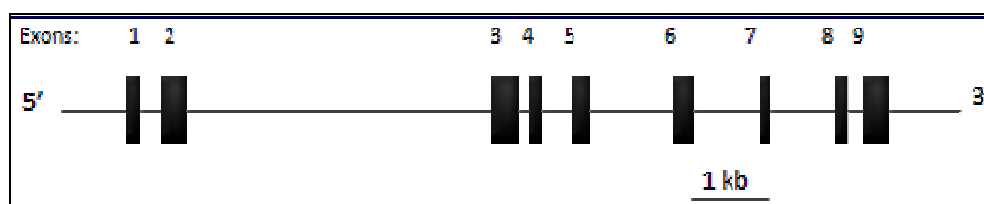


Figura 07. Estructura del gen de la ciclina A1 (*CCNA1*) de *Homo sapiens*. Los exones están representados por rectángulos negros y los intrones por líneas negras. Fuente: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CCNA1ID949ch13q13.html>

La *CCNA1* en el hombre presenta tres variantes: “isoforma a” con una longitud de 465 aminoácidos (aa) (NCBI Reference Sequence: NP_003905.1), “isoforma b”: 464 aa (NCBI Reference Sequence: NP_001104515.1) e “isoforma c” con 421 aa NCBI (Reference Sequence: NP_001104516.1).

Estudios mutacionales de las secuencias de ciclinas han identificado que todas comparten homología altamente conservada en un dominio o caja llamada “cyclin box”, la cual es una región requerida para unirse a la región N-terminal de las Cdk para activarlas (Nugent *et al.*, 1991; Lees y Harlow, 1993; Noble *et al.*, 1997; Humphrey y Brooks, 2005; Brunet, 2006) (Figura 08 y 09).



Figura 08. Esquema de la proteína de la *CCNA1*. Fuente: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/CCNA1ID949ch13q13.html>

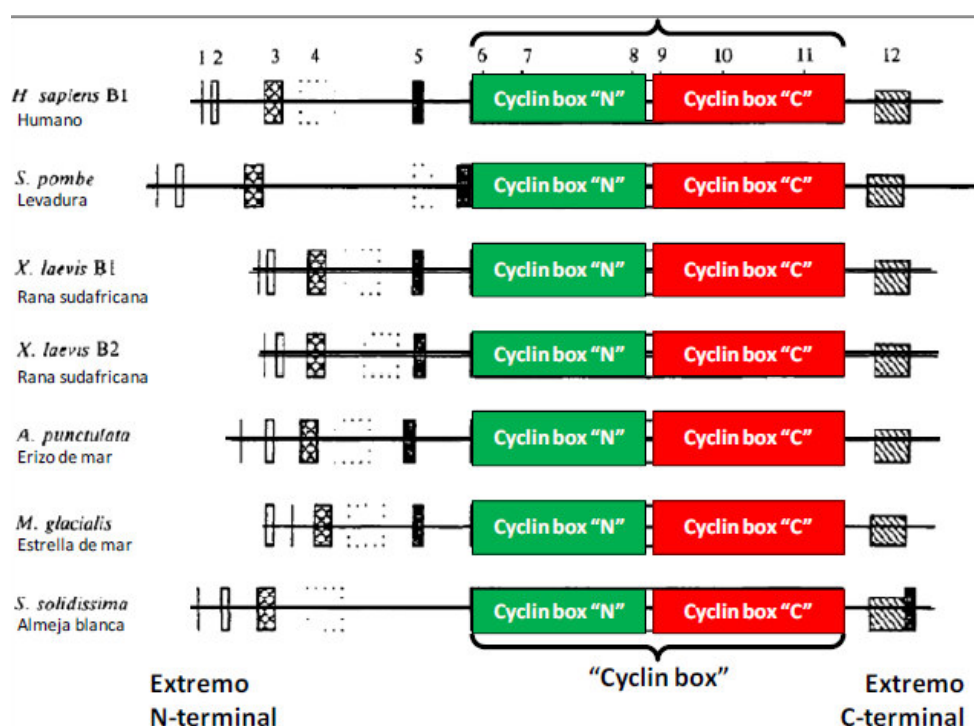


Figura 09. Comparación esquemática de las secuencias de aminoácidos de las tipo ciclinas B. Siete secuencias son mostradas a escala, la línea negra horizontal indica el largo de la secuencia. Las cajas alineadas que cubren una región de 220 aminoácidos (de 150 a 370 aminoácidos en la ciclina B1 de *H. sapiens*; contiene las regiones de 6 a 11) son llamadas "cyclin box". Las cajas marcadas 1 a 5 y 12 indican otras regiones homólogas (imagen modificada de Nugent *et al.*, 1999). Fuente: Tataje, 2010.

La ciclina A1 y A2 de ratón comparten aminoácidos en un 42%, sin embargo conservan una similaridad del 84% en sus dos cajas conservadas (cyclin box) (Sweeney *et al.*, 1996). La similaridad de expresión entre la *CCNA1* humana y de ratón fue confirmada a través de modelos transgénicos (Müller *et al.*, 2000).

CCNA1 ha demostrado ser esencial para la fertilidad del macho y es expresada en altos niveles en la fase G2 durante la primera división meiótica, tanto en espermatoцитos paquitenos y diplotenos (Sweeny *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Liu D *et al.*, 1998, 2000; Ravník y Wolgemuth, *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2000, 2001, 2003, 2004; Schrader *et al.*, 2002a; Wolgemuth *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2003; Van der Meer *et al.*, 2004, Diederichs *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2004; Lele *et al.*, 2004, Salazar *et al.*,

2005). Ésta elevada expresión es esencial en la meiosis por su unión a Cdk2, lo cual se ha estudiado en diversos organismos como ratones *knock-out* (Liu D *et al.*, 1998; 2000), *Xenopus* y células humanas (Yang *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2002a; Wolgemuth *et al.*, 2002).

La ciclina A1 es detectable en otras células solamente en condiciones patológicas, tales como en casos de leucemia en humanos (Müller *et al.*, 2000) o en roedores cuya sobre expresión conduce a leucemias (Liao *et al.*, 2001).

La inactivación experimental del gen *CCNA1* en ratones *knock-out* demostró que la deficiencia de este gen produjo ratones infértiles por bloqueo de la espermatogénesis antes de la primera división meiótica, pero con fenotipo aparentemente normal. Este estancamiento de la meiosis fue asociado con el incremento de células germinales en la apoptosis y en la reducción de la activación de la quinasa de Cdc2 al final de la profase meiótica (Liu D *et al.*, 1998).

La expresión de mRNA de ciclina A1 fue medida por RT-qPCR en tejido testicular de pacientes con variada etiología fértil e infértil lo cual se correlacionó con los desórdenes y trastornos gaméticos espermáticos. Finalmente los autores afirmaron que la *CCNA1* puede ser útil para diagnóstico molecular complemento del estudio histopatológico para evaluar la fertilidad en humanos (Schrader *et al.*, 2002a, 2002b).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Si la ciclina A1 se expresa en el tejido testicular de alpaca, esta expresión estaría en relación directa a la concentración espermática.

3.2. Objetivo general

Evaluar la presencia de ciclina A1 (*CCNA1*), cuantificar su expresión en tejido testicular de alpaca (*Lama pacos*) y correlacionar los resultados con la concentración espermática.

3.3. Objetivos específicos

- Colectar biopsias testiculares de alpacas en edad fértil.
- Evaluar diversos parámetros fisiológicos de las muestras analizadas.
- Diseñar primers capaces de amplificar parte del gen de la ciclina A1 en alpaca.
- Confirmar la presencia del mRNA de la ciclina A1 en alpaca.
- Diseñar primers específicos exon-exon junctions (E-E-jn) para amplificar el mRNA de la ciclina A1.
- Cuantificar relativamente la expresión de la ciclina A1 con respecto a un housekeeping adecuado.
- Correlacionar la expresión relativa de la ciclina A1 con los resultados fisiológicos de las muestras en estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se muestra un esquema general de la metodología experimental realizada durante el presente trabajo (Figura 10)

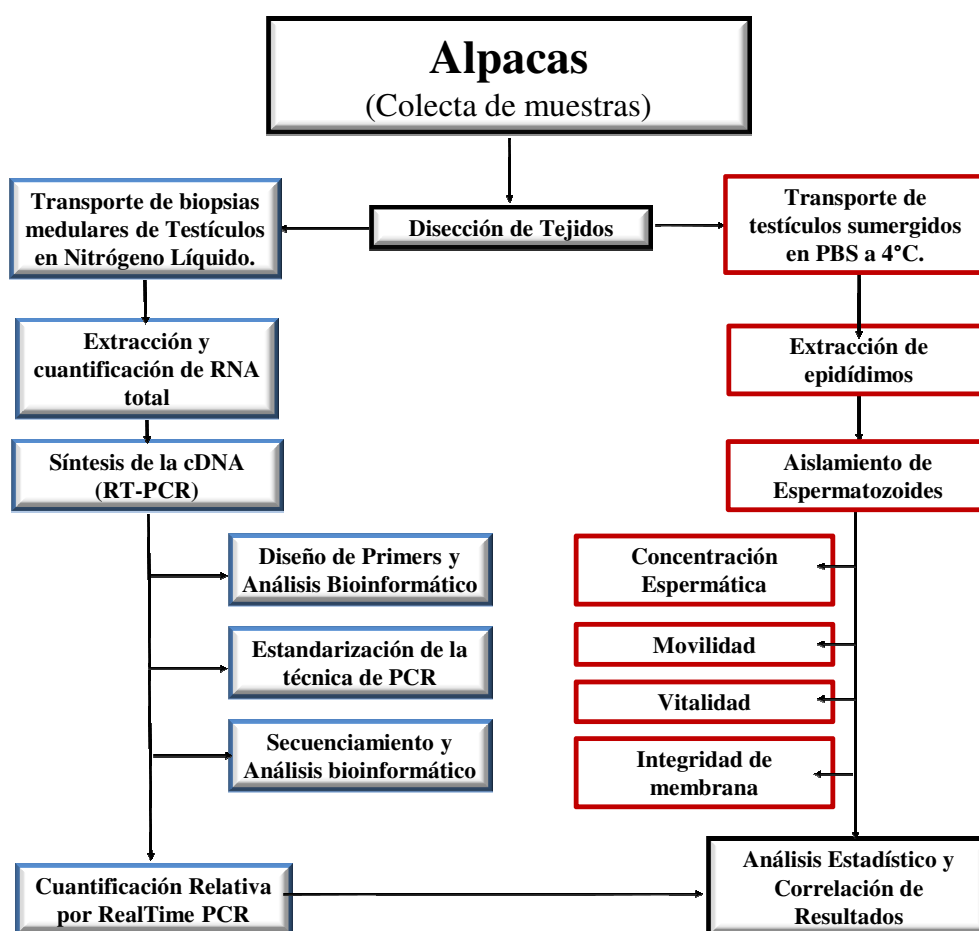


Figura 10. Esquema de la metodología experimental

4.1. Muestreo

Se consideraron para este estudio 35 alpacas macho beneficiadas en el Camal Municipal de Huancavelica (Figura 11). Estos ejemplares eran sexualmente maduros de raza Huacaya, con edad mínima de 4 años por determinación de desarrollos dentarios. Las alpacas eran de diversas variedades (colores) y de edad fértil, y en buen estado sanitario lo cual fue

corroborado por el veterinario de turno del Camal Municipal de Huancavelica.



Figura 11. Frontis y exteriores del Camal Municipal de Huancavelica. Fuente: Fotos del proyecto.

El “Camal Municipal de Huancavelica” fue construido para dar solución al problema del camal informal y para satisfacer las necesidades que se tiene en la industrialización de la carne mediante una infraestructura moderna y funcional. Está ubicado en el sector: Totoral Anexo de Callqui Chico. A 3,680 msnm. Abarca un área aproximada de 10,000.00 m² distribuidos en zonas de Beneficio e industrialización de derivados cárnicos, siendo: Zona de abastecimiento, Área de Beneficio, Conservación en frío, Zona de Comercialización, Zona de Energía, Zona de Servicios generales, Zona de Tratamiento de Aguas residuales y Zona Administrativa (Figura 12).



Figura 12. Interiores del Camal Municipal de Huancavelica. A) Zona de abastecimiento: Se aprecian alpacas, ovejas y llamas esperando a ser beneficiadas. B) Área de Beneficio para Camélidos: Se aprecian alpacas beneficiadas y despellejadas, ese es el momento cuando se colectan los testículos con colaboración de los trabajadores del camal. Fuente: Fotos del proyecto.

En el camal, se retiraron ambos testículos del animal sacrificado. Uno de los testículos se mantuvo íntegro con su epidídimo correspondiente, fue colocado en recipientes de 100 ml, sumergido en suero fisiológico y rodeado de geles pack refrigerantes a 4 °C para su inmediato transporte al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (LFRA-UNMSM), en Lima (Figura 13).



Figura 13. Transporte de testículos y ovarios íntegros. Testículos y Ovarios sumergidos en PBS y mantenidos a 4°C para su transporte hacia el LFRA-UNMSM para las correspondientes pruebas fisiológicas. Fuente: Fotos del proyecto.

Al otro testículo se le realizaron medidas y pesaje *in situ*, se procedió realizar una biopsia de médula testicular de 1 cm³ usando previamente agua tratada con Diethylpyrocarbonate (DEPC) como inhibidor de RNasas. Dichas muestras se conservaron en crioviales debidamente rotulados y sumergidos en nitrógeno líquido (NL) para su traslado hacia Lima (Figura 14).



Figura 14. Estación de trabajo para colecta de muestras *in situ*.
Fuente: Fotos del proyecto.

4.2. Evaluación espermática

Se realizó en el LFRA-UNMSM, dentro de las primeras 24 horas de colectada la muestra, siguiendo lineamientos basados en las normas estipuladas por la OMS (WHO, 2010). Se tomaron en cuenta cuatro parámetros reproductivos: concentración, vitalidad, motilidad e integridad de

membrana. Al llegar al laboratorio, las gónadas fueron lavadas en Buffer fosfato salino (PBS) a 4 °C. Usando pinzas y tijeras quirúrgicas se extrajeron el testículo y el epidídimo tras abrir y retirar el tejido conectivo (la bolsa escrotal y la túnica albugínea). Todos los conteos fueron realizados bajo observaciones en microscopio óptico del campo claro (400X).

4.2.1. La concentración espermática

El epidídimo fue colocado en una nueva placa de Petri estéril, bañado y lavado en PBS a 38 °C, se procedió a realizar el trozado (picadillo) del epidídimo a fin de liberar el contenido espermático, empleando una tijera con cuidado de no cortar venas. Del contenido liberado se tomó 10 µl de solución inicial de espermatozoides diluidos en 990 µl de agua destilada y se depositaron en un tubo eppendorf® de 2 ml. De la mezcla, se evaluaron 10 µl en cada lado de la cámara o hemocitómetro de Neubauer. Se contaron los espermatozoides en los 25 cuadrados y se multiplicó por 10^6 por volumen de solución.

4.2.2. Movilidad progresiva total

Se tomó 20 µl de la suspensión inicial y fueron colocados en una lámina portaobjeto, adicionándole una laminilla cubreobjetos, y se procedió a contar al menos 10 campos. La movilidad fue evaluada de acuerdo al criterio del Organismo Mundial de la Salud (WHO, 2010), donde sugiere clasificar los espermatozoides en:

- Movilidad a = Movilidad progresiva rápida,
- Movilidad b = Movilidad progresiva lenta,
- Movilidad c = Movilidad no progresiva,
- Movilidad d = Inmóviles.

Se determinó el parámetro de movilidad progresiva total como la suma de las movilidades progresivas “a + b”. Para cálculos estadísticos,

la variable fue expresada como porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles.

4.2.3. Prueba de viabilidad

Se realizó mediante un ensayo de exclusión con coloración con vital Eosina Y (al 0.5 %) previamente incubado a 38 °C. Para lo cual se incubó una gota de muestra con una gota del colorante a 38 °C por 15 minutos. El porcentaje de vitalidad se consigue al realizar el conteo de 100 espermatozoides, y determinar cuántos de ellos tiñeron y cuantos no. Se evaluaron cinco campos y se usó como variable estadística el porcentaje de células vivas (WHO, 2010). Tomando en cuenta que:

- Espermatozoides incoloros: Espermatozoides vivos
- Espermatozoides de color anaranjado: Espermatozoides muertos.

4.2.4. Integridad de membrana (Prueba de HOS)

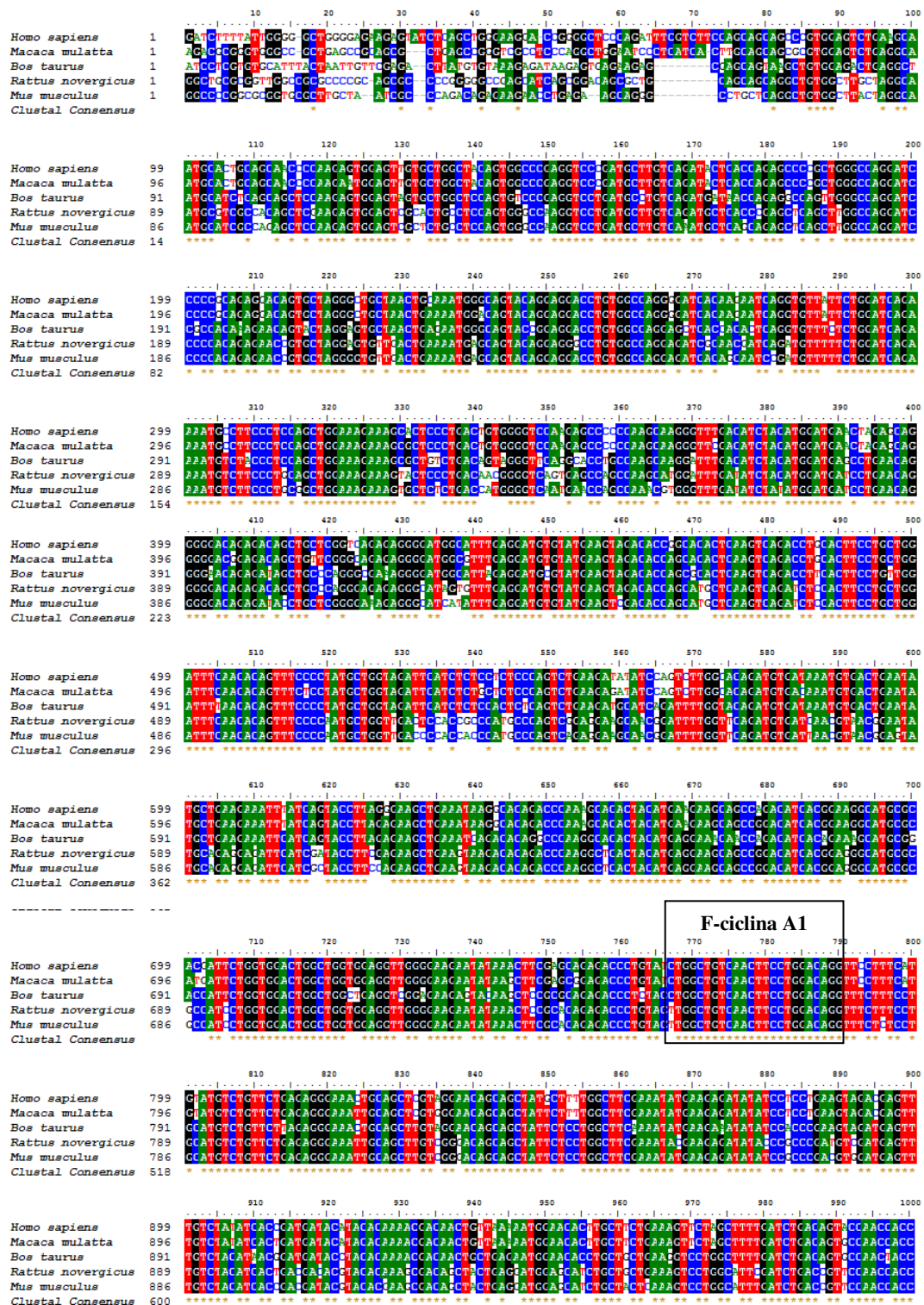
Se realizó el Test Hipoosmótico (HOS test), para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática. Dicho test consiste en incubar 100 µl de la muestra en 900 µl de una solución de fructosa-citrato a 600 miliosmoles (mOsm) por 30 minutos a 38 °C, si la membrana plasmática es funcional, se produce endósmosis, que se manifiesta con un enrollamiento o engrosamiento a nivel de la cola del espermatozoide. El porcentaje de integridad de membrana se consigue al realizar el conteo de 100 espermatozoides, y determinar cuántos de ellos manifiestan los patrones (WHO, 2010):

- Espermatozoides con el flagelo enrollado o engrosado: Espermatozoides con la membrana intacta.
- Espermatozoides con el flagelo recto, sin enrollamiento o engrosamiento de ninguna clase: Espermatozoides con la membrana alterada.

4.3. Diseños de cebadores

Al no existir genomas de alpaca disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó una búsqueda de genes homólogos a *CCNA1* en especies medianamente emparentadas con la alpaca por medio del servidor Blast del NCBI: *Homo sapiens* (gi 16306528); *Macaca mulatta* (gi 109120473); *Rattus norvegicus* (gi 58865467); *Mus musculus* (gi 141802415); *Porcine testis* (gi 84133010); *Bos taurus* (gi 119904576).

Una vez obtenidas las secuencias en formato FASTA, se realizó un alineamiento múltiple usando el programa Clustal X v.1.83 (Figura 15) y manualmente se buscaron regiones conservadas para diseñar potenciales primers, los cuales fueron sometidos a un análisis bioinformático con la finalidad de minimizar la formación de estructuras secundarias y obtener el menor grado de degeneración. Para este fin se usaron programas como FastPCR Professional. v.5.1.83. Copyright© 2006-2007 “PrimerDigital Ltd” para determinar el tamaño y la viabilidad de posibles amplicones durante el PCR; la herramienta online IDT SciTools OligoAnalyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para evaluar potenciales estructuras secundarias y el servidor Mfold (Zuker, 2003) para visualizar estructuras secundarias en los amplicones y la ubicación de las mismas dentro de todo el gen. Los parámetros usados para las simulaciones fueron: 50 °C y a 60 °C, 50 mM NaCl, 1.6 mM MgCl₂ (Figura 16, 17 y Tabla 03).



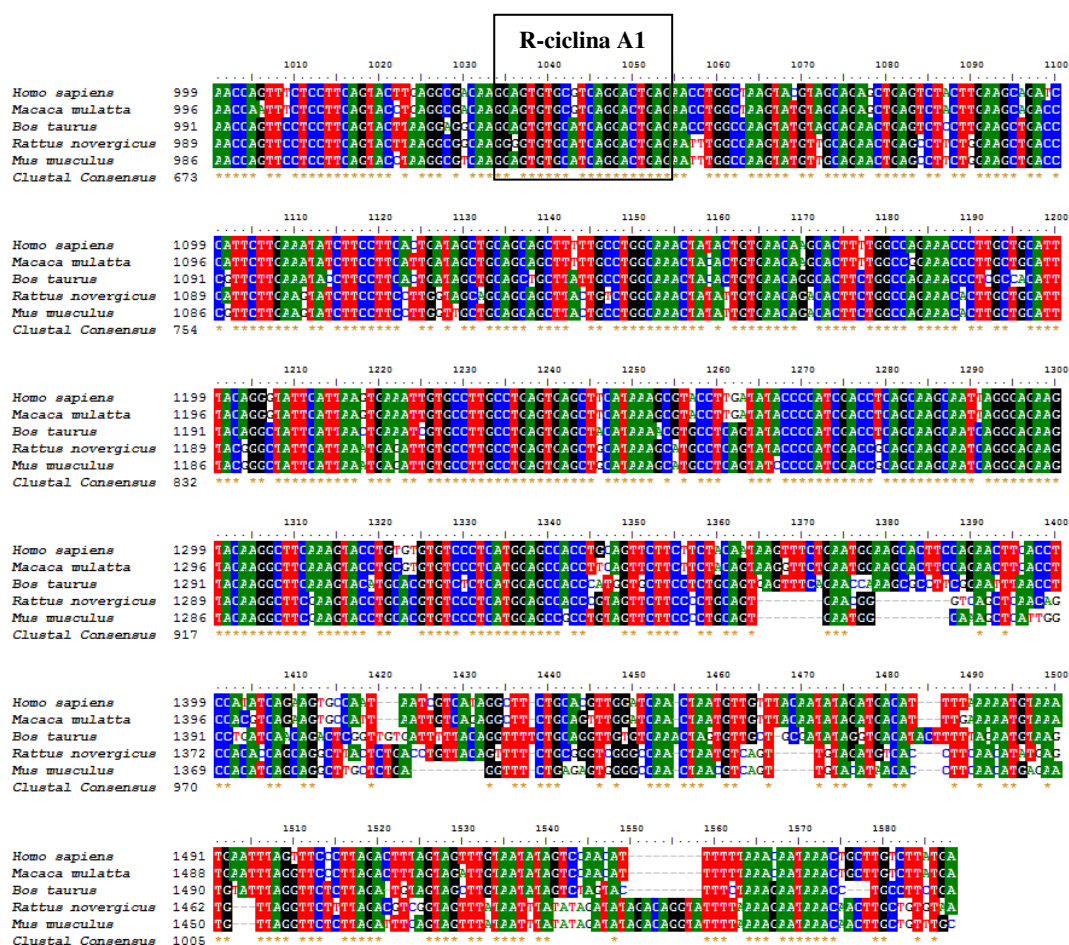


Figura 15. Captura de pantalla del programa BioEdit donde se muestra el resultado del alineamiento múltiple usando el programa ClustalX. Se usaron las secuencias de nucleótidos de *Homo sapiens* (gi 16306528); *Macaca mulatta* (gi 109120473); *Rattus norvegicus* (gi 58865467); *Mus musculus* (gi 141802415); *Porcine testis* (gi 84133010); *Bos taurus* (gi 119904576). En bloques de colores resaltantes y estrellas se destacan las regiones conservadas. Se muestra el alineamiento completo con una longitud total de alineamiento es de 1576 nucleótidos. Se muestra la ubicación del primers “F-ciclina A1” (entre los nucleótidos 768 y 790) y “R-ciclina A1” (entre los nucleótidos 1034 y 1054).

DNA folding form

Users of this service are requested to cite:

M. Zuker
 Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res. **31** (13), 3406-15, (2003)
[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[Supplementary Material\]](#) [\[Additional Information\]](#)

The [free energies](#) used are from the [laboratory](#) of John SantaLucia Jr.
 An appropriate citation for these energy rules is:
 SantaLucia, Jr (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 1460-1465. [\(Abstract\)](#)

For the salt correction, please cite:
 Peyret, N. (2000) Prediction of Nucleic Acid Hybridization: Parameters and Algorithms PhD dissertation, Wayne State University, Department of Chemistry, Detroit, MI

Enter sequence name:

Enter the sequence to be folded in the box below. All non-alphabet characters will be removed.
 FASTA format may be used.

a)

5. prohibit bases *i* to *j* from pairing with bases *k* to *l* by entering:
P i-j k-l on 1 line in the constraint box.

☐ The DNA sequence is

☐ Folding temperature (between 0° and 100° C)

☐ [Ionic conditions](#): [Na⁺] [Mg⁺⁺]

Units: M ☐ mM ☒ Correction type: Oligomer ☐ Polymer ☒

☐ Enter the [percent suboptimality](#) number.

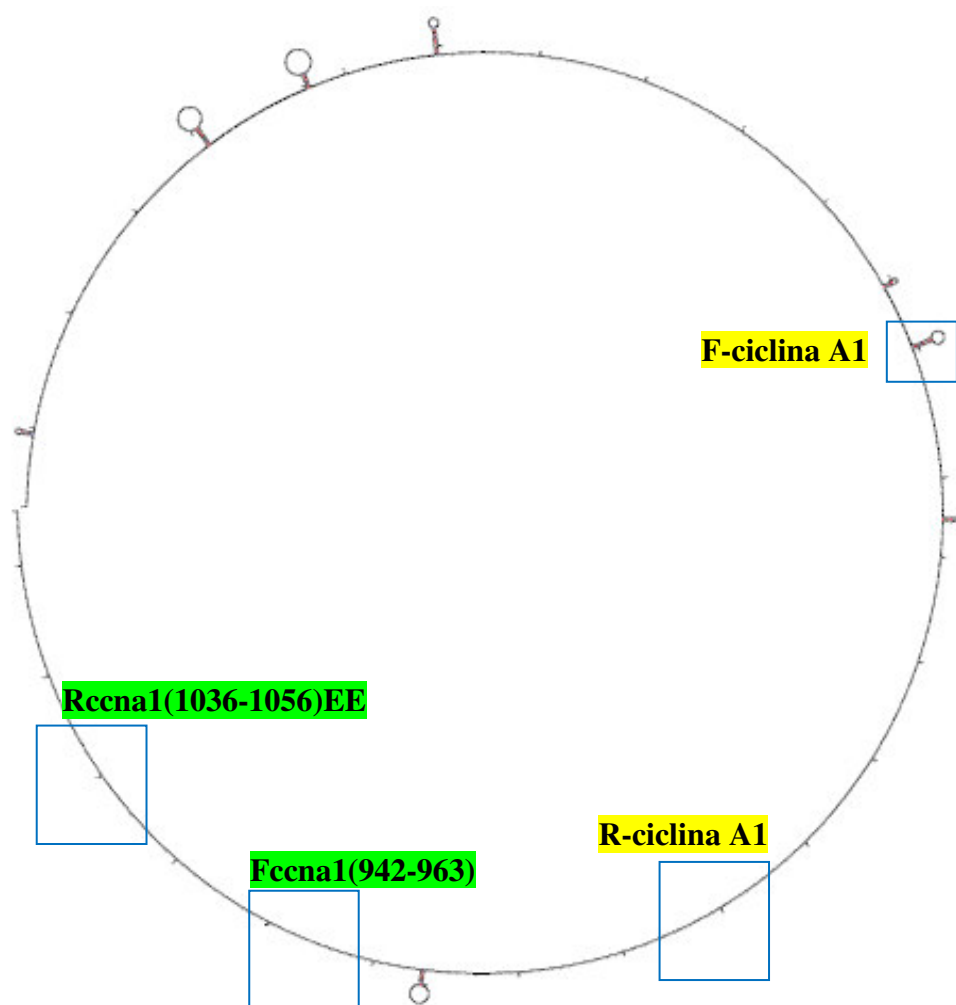
☐ Enter an [upper bound](#) on the number of computed foldings.

☐ Enter the [window](#) parameter if you wish.

☐ Enter the [maximum distance between paired bases](#) if you wish.

b)

Figura 16: Programa Mfold. a) Interfaz del programa Mfold para plegamiento de estructuras de DNA. b) Parámetros utilizados en el programa Mfold para simular formación de estructuras secundarias en los target de los primers y en los amplicones. Fuente: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>



dG = -4.69 12Dec13-10-29-22

Figura 17. Predicción de estructuras secundarias de la secuencia codificante de ciclina A1 del transcripto teórico de alpaca usando el servidor Mfold. Se usaron los valores: 60 °C, 50 mM NaCl y 1.6 mM MgCl₂. En amarillo, se muestra la ubicación del primer par de primers y en verde la ubicación del segundo par de primers. Nótese que a la temperatura de 60 °C se resuelven la mayor parte de las horquillas que contienen los primers diseñados.

Tabla 03. Primer par de primers usados para detectar parte de *CCNA1*.

Nombre del primers y secuencia	Detalles	Longitud de amplicón: 287 pb tm: 83.1 °C
>F-ciclina A1 tggctgtcaacttctggacagg	23 nt 58.8 °C CG: 56.5 %	tggccgtcaacttctggacagg ttcct gtcgtgcatgtctgttctgagagggaaact gcagctcgtaggaacggcagctattctgc tggcttcgaaatatgaagaaatataccca
>R-ciclina A1 ctcagtctgaYgcacacYcc	21 nt 58.3 °C CG: 61.9 %	ccagaagtagacgagttgtctacataac cgatgacacttacacaaaacgacaactg ctgagaatggaacacctgctcctgaaggt cctggcttttgatctgacgggtccaaccac caaccagtttctccttcagtacttacggag gcag ggAgtgtgcGtcaggactgag

El primer reverse “R-ciclina A1” contiene un par de posiciones degeneradas, sombreadas en negro. En color amarillo se indica el target de cada primer.

Durante el desarrollo de la tesis, constantemente se buscaron nuevas secuencias de alpacas en el NCBI, hasta que se hallaron nuevas secuencias provenientes del borrador genómico de la alpaca (Número de acceso: ABRR01000000 - *Lama pacos* scaffold_genomic scaffold, whole genome shotgun sequence) dentro de las cuales se incluían regiones homólogas a *CCNA1*. A partir de estos fragmentos hallados, el siguiente paso fue cruzar la información genómica disponible con disponible de *CCNA1* de *Bos taurus*, (un artiodáctilo al igual que la alpaca), con su transcripto por medio de la herramienta on-line MGAlignIt (Lee *et al.*, 2003) (Figura 18). Así se logró ensamblar *in silico* una la secuencia nucleotídica completa del gen de interés e inferirse la distribución y tamaño de los exones e intrones (Figura 19 y Tabla 04).

MGAlign
enome
a tool for aligning mRNA Sequences to Genomic Sequences

[Introduction](#) | [Downloads](#) | [MGAlignIt](#) | [Examples](#) | [Comparison](#) | [Methodology](#) | [Help](#)

MGAlignIt Web Service

Please paste the sequences into the text boxes below and hit the submit button. If you need help in using this website, there is a [Tutorial](#) as well as [specific help](#) on this "Use it" page. There is also [specific help](#) on the results returned by this page.

To try out the service, click [here](#) for some examples.

Currently, we are unable to accept GenBank Accession Numbers as inputs. This will be addressed in future releases of this web service. Meanwhile, there are [instructions](#) available illustrating the steps required to copy GenBank sequences into the text boxes below.

This web service accepts the following file formats:

- Plain sequences pasted into the text boxes below.
- Plain and FASTA formatted sequence files created in Text Editors such as Microsoft Notepad.
- Plain and FASTA formatted sequence files created in Word Processors such as Microsoft Word provided that the files are saved in plain text.

If you encounter any problems using the web service, please email bernett@bic.nus.edu.sg together with the input files and we will try to solve your problem as soon as possible.

Please cite the following reference should you use this web service:

Lee, B.T.K., Tan, T.W. and Ranganathan, S. (2003) MGAlignIt: a web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences. Nucleic Acids Research, 31(13), 3533-3536.

Input Sequences

Paste plain mRNA/EST Sequence below (25,000 nucleotides maximum)

or select a FASTA file from your local disk below ([example](#))

Paste plain Genomic Sequence below (250,000 nucleotides maximum)

or select a FASTA file from your local disk below ([example](#))

National University of Singapore
Department of Biochemistry

PYTHON powered

Figura 18. Interfaz del MGAlignIt Web Service. Usado para ensamblar *in silico* el transcripto de *CCNA1* de *Lama pacos* a partir de una comparación con el *CCNA1* de *Bos taurus*.

Fuente: <http://proline.bic.nus.edu.sg/mgalign/mgalignit.html>

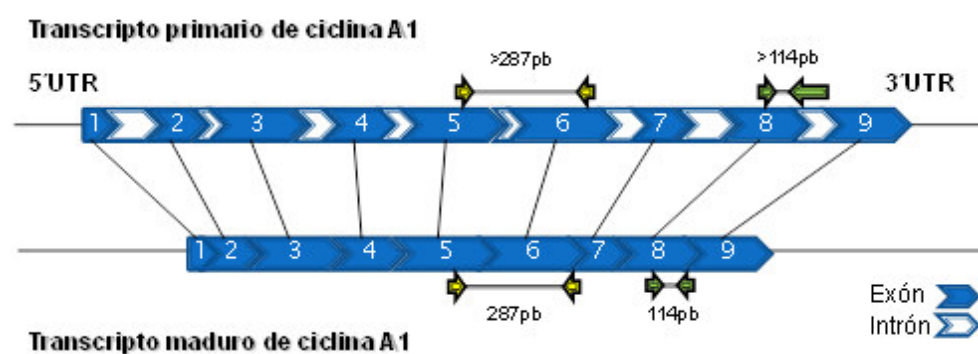


Figura 19. Representación esquemática del transcrito teórico de alpaca para el gen de la ciclina A1 obtenido *in silico*. Los intrones están representados por recuadros blancos y los exones están representados por rectángulos celestes. Los primers “F-ciclina A1” y “R-ciclina A1” en color amarillo amplifican una región de ± 287 pb entre los exones 5 y 6.

Los primers “Fccna1(942-963)” y “Rccna1(1036-1056)EE” amplifican una región de 114 pb entre los exones 8 y 9.

Tabla 04. mRNA teórico de *CCNA1* de alpaca, la distribución de sus 9 exones y la ubicación de los primers diseñados.

<p>>mRNA ciclina A1 de alpaca (teórico inferido a partir de mRNA de Bos Taurus)</p> <p>//tctggcttgtagag/1/INTRON/2/aggggctcacaacactcaagtgttctctggatcagaa aatgtctggcctccagctggaaagacagcgctctccgac/2/INTRON/3/gccaagcaaggg tttgacatctacatggatgagcctgagcagggggacagagacagctgctggggcaagaggg gatggcgtttgaggagccctacgaagtagacaccagcacgctcaagtcagaccttcacttctgc tggatttaacacag/3/INTRON/4/ttcccctatgctggtggattcatctctccacccgcagcct gaagatgcatcagattttggtacagatgtgataaatgtgactgaatatgctgaagaaattcatcagt acctagagaagccgaa/4/INTRON/5/agacacaggcccaaggcgcactacatgaagaa gcagccagacatcacggaaggcatgcgacgattctggtggactggctggtggaggtgggcga ggagtacaaactccgggaggagaccctctaccTGGCCGTCAACTTCCTGGACAG Gttctgtctgcatgtctgttctgagagggaaactgcagctcgtaggaacggcagctattctgctg gcttc/5/INTRON/6/aaatatgaagaaatatacccaccagaagtagacgagttgtctacata accgatgacacttacacaaaacgacaactgctgagaatggaacacctgctcctgaaggctctgg ctttgatctgacggtgcccaaccaccaaccagtttctccttcagtacttacggaggcagGGAGT GTGCGTCAGGACTGAGaacctggccaag/6/INTRON/7/tacgtagcagaactga gtctcctgaagctgacctgttctgaaatatcttccttcactgatagctgcagccgcttactgcctggc aaactatactgtgaacaggcacttctgg/7/INTRON/8/ccagaaaccttgcctgctttacag gctattCATTAAGTGAAATTGTGCCCTGcctgagtgagctacataaagcgtgcctcg ttataccccaccggccccagcaagcaatcaggggagaagtataaGACTTCAAAGTA/8/ INTRON/9/TGCACGTGTccctcatggagccacccgcagtcctccctctgcagtaagttct agaactgaagcactttcggaacttcacctctggatcaaca//</p>
--

En amarillo se muestra la ubicación del par de primers diseñados para detectar la presencia del gen *CCNA1*. En verde se indica la ubicación del par de primers diseñados en base al mRNA teórico. Con los números del 1 al 9, se indica la ubicación de cada uno de los 9 exones.

Basados en la secuencia ensamblada, se diseñó un nuevo par de primers E-E-jn para detectar el extremo 3' del mRNA de *CCNA1*, con un amplicón de menor tamaño y ubicados en una región diferente a los primers iniciales (Tabla 05).

Tabla 05. Segundo par de primers para detectar y cuantificar relativamente los exones 8 y 9 de *CCNA1* de alpaca.

Nombre del Primers y secuencia	Detalles	Longitud del amplicón: 114 pb tm: 82.3 °C
>Fccna1(942-963) cattaagtgaattgtgccctg	22 nt 60.4 °C CG: 40.9 %	cattaagtgaattgtgccctg cctgagt gagctacataaagcgtgcctcggtataccc caccggccccagcaagcaatcaggag aagtataa gacttcaaagtatgcacgtg
>Rccna1(1036-1056)EE acacgtgcatactttgaagtc	21 nt 61.2 °C CG: 42.9 %	

El primer reverse “Rccna1(1036-1056)EE” es E-E-jn y se une a los exones 8 y 9 del *CCNA1* teórico de alpaca. En color verde se indica el target de cada primer.

4.4. Aislamiento, purificación y cuantificación del RNA total

Las biopsias medulares de testículo preservadas en nitrógeno líquido, fueron descongeladas lentamente a temperatura ambiente, se les agregó 1ml del reactivo TRIreagent® (Sigma Aldrich), para luego homogenizarlas con ayuda de un pequeño motor de uso odontológico (Powertec mini-grinder PT1403) a 15,000 rpm (Figura 20), usando cabezales abrasivos. Para evitar la contaminación cruzada después de cada muestra, el cabezal fue enjuagado profusamente con hipoclorito de sodio al 2.5 % y después con agua tratada con DEPC. A continuación se aisló el RNA total siguiendo las

instrucciones comerciales con volumen final de 50 μ l. La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (UNICO® modelo: UV2100Spectrophotometer), tomando la medida de absorbancia de A_{260}/A_{280} correspondiente a 40 μ g de RNA.

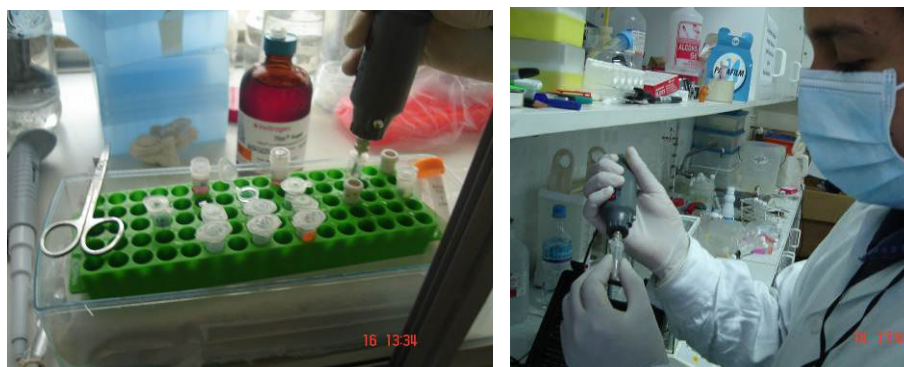


Figura 20. Lisis de tejido testicular usando el Powertec mini-grinder PT1403

4.5. Tratamiento con DNasas y síntesis de cDNA

Para minimizar los posibles falsos positivos el RNA obtenido fue sometido a un tratamiento con DNases usando Deoxyribonuclease I (DNaseI), RNase-free (Fermentas). Se partió de 1 μ l de RNA total, con volumen final de 10 μ l. La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó en el termociclador “Multigene® TC9600” usando “Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit” (Fermentas), a partir de 2 μ l del RNA tratado con DNases con volumen final de 20 μ l usando en simultaneo “oligo dT primers” y “random primers”.

4.6. Optimización de cebadores

La estandarización de ambos juegos de cebadores se realizó en termociclador convencional (Termociclador MiniCycler™ MJ Research®). Las condiciones de amplificación fueron: 1.67 mM de $MgCl_2$, 0.2 μ M de dNTPs, 0.67 μ M de cada primer, 0.2 M de Trehalosa (#T3663), 0.5 U de Taq Recombinante (Fermentas DreamTaq®) y 2 μ l de cDNA en un volumen final de 15 μ l. Las condiciones de ciclaje fueron: Denaturación inicial por 5

minutos a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de: 95 °C, 60 °C, 72 °C por 30 segundos cada temperatura, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos obtenidos fueron visualizados en gel de bis-acrilamida al 8 % o agarosa al 2 % (Figura 21 y 22).

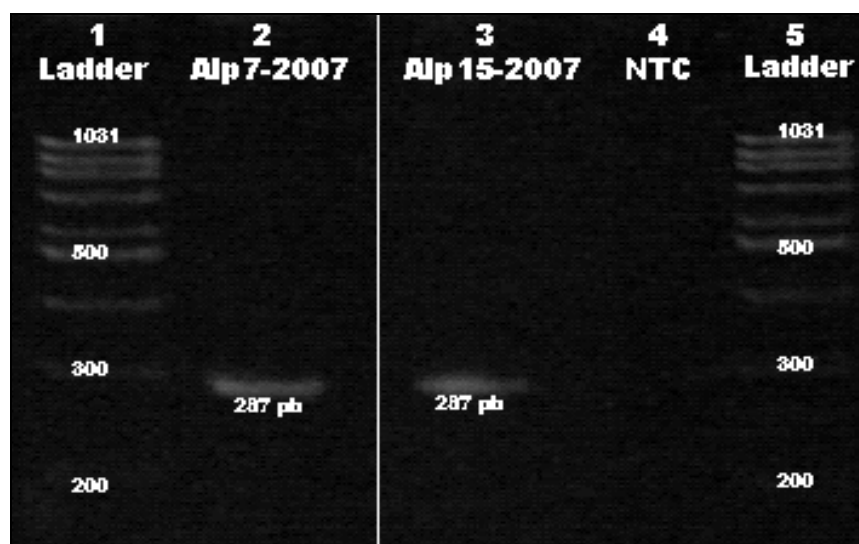


Figura 21. Gel de bis-acrilamida al 8%. Bandas obtenidas en el carril 2 y 3 corresponden al producto esperado de 287 pb con los primers “F-ciclina A1” y “R-ciclina A1” (Primer par de primers diseñados para detectar el gen de ciclina A1). Carril 4: Control negativo (NTC).

Fuente: Fotos del proyecto.

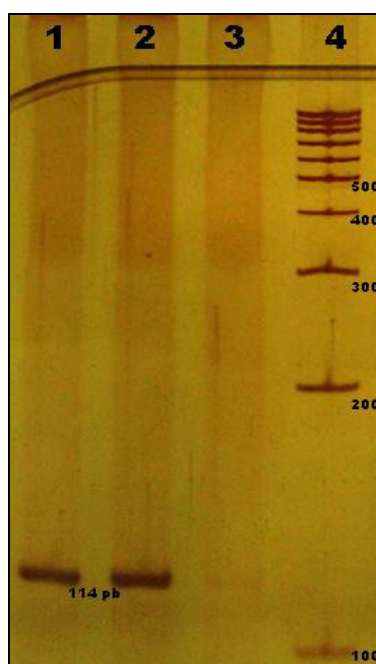


Figura 22. Gel de bis-acrilamida al 8%. Las bandas obtenidas en los carriles 1 y 2 corresponden al producto esperado de 114 pb con los primers “Fccna1(942-963)” y “Rccna1(1036-1056)EE” (Segundo par de primers diseñados para medir la expresión del gen de ciclina A1), estos son los primers que se usaron posteriormente para la técnica de real-time PCR. El carril 3 es el control negativo (NTC). Fuente: Fotos del proyecto.

4.7. Secuenciamiento y alineamiento local.

Alícuotas de los productos se enviaron a secuenciar por el método de Sanger (Macrogen Corea del Sur) por el método "Standard-Seq Single", el cual permite un procesamiento rápido de los productos de PCR sin purificar. Los resultados fueron revisados y curados por medio del programa BioEdit, el cual posee herramientas incorporadas para el manejo de resultados del secuenciamiento de tipo Sanger (Hall, 1999).

Con la finalidad de confirmar la identidad de los genes amplificados se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas usando el programa “nucleotide BLAST” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se usaron los parámetros por defecto, modificando las siguientes variables: Database: “Others (nr etc.)” y “Reference RNA sequences (refseq_rna)” para buscar en la base de

datos “NCBI Transcript Reference Sequences”; “Optimize for: More dissimilar sequences (discontiguous megablast)” para permitir algunos mismatches y comparar la secuencia obtenida con otras especies (Figura 23).

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. The 'Choose Search Set' section has 'Database' set to 'Reference RNA sequences (refseq_rna)' and 'Organism' set to 'Human genomic + transcript'. The 'Program Selection' section has 'Optimize for' set to 'More dissimilar sequences (discontiguous megablast)'. The 'BLAST' button is highlighted, and the search parameters are displayed below it: 'Search database Reference RNA sequences (refseq_rna) using Discontiguous megablast (Optimize for highly similar sequences)'. There is a checkbox for 'Show results in a new window' which is checked. A note at the bottom states: 'Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign'.

Figura 23. Parámetros usados en el programa nucleotide BLAST para confirmar la identidad de los amplificados y la secuencia teórica del transcripto completo de *CCNA1* de alpaca.

Fuente: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

4.8. RT-qPCR.

El PCR en tiempo Real se realizó con el sistema LightCycler® 480 II de Roche Applied Science con el fluorocromo “SYBR Green I”. El volumen final de la reacción de 12 µl: 4.8 µl de LightCycler® 480 SYBR Green I Master; 6 µl de H₂O, PCR-grade, 10 µl de LightCycler®480 SYBR Green I Master, 1.2 µl de cada primer (0.5 µM), 1.2 µl de cDNA. Fue depositado en la placa de 96 pocillos, reaccionados y analizados en el LightCycler®480 II. Como gen referencial (housekeeping) se tomó el amplicón de 154 pb correspondiente al gen “*RPL0*” de alpaca (HQ385999.1, previamente secuenciado y publicado en NCBI por nuestro grupo) (Tabla 06) con duplicados técnicos empleando el promedio.

Tabla 06. Accesoión HQ385999.1 correspondiente al amplicón del gen *rpl0* que se evaluó mediante RT-qPCR. Secuencia usada como housekeeping para normalizar la expresión de *CCNA1*.

Lama pacos acidic ribosomal protein large P0 mRNA, partial cds

GenBank: HQ385999.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☐

```

LOCUS      HQ385999                156 bp    mRNA    linear    MAM 01-JUL-2011
DEFINITION Lama pacos acidic ribosomal protein large P0 mRNA, partial cds.
ACCESSION  HQ385999
VERSION    HQ385999.1   GI:308756019
KEYWORDS   .
SOURCE     Vicugna pacos (alpaca)
  ORGANISM Vicugna pacos
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
            Camelidae; Vicugna.
REFERENCE  1  (bases 1 to 156)
  AUTHORS  Florentini Carranza,E.A., Vasquez Caverro,J.H., Tataje Lavanda,L.A.
            and Valdivia Cuya,M.E.
  TITLE    Molecular markers for fertility in alpaca
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2  (bases 1 to 156)
  AUTHORS  Florentini Carranza,E.A., Vasquez Caverro,J.H., Tataje Lavanda,L.A.
            and Valdivia Cuya,M.E.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (09-OCT-2010) Laboratorio de Fisiologia de la
            Reproduccion Animal (LFRA), UNMSM, Av. Venezuela Cdra.34, Lima 01,
            Peru
FEATURES   Location/Qualifiers
     source          1..156
                     /organism="Vicugna pacos"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:30538"
                     /tissue_type="testis"
     CDS             <1..>156
                     /note="RPLP0"
                     /codon_start=2
                     /product="acidic ribosomal protein large P0"
                     /protein_id="AD051064.1"
                     /db_xref="GI:308756020"
                     /translation="IEILTDVQLIKTGDKVGASEATLLNMLNISPFSGLIQQVFDN
                     GSIYNPE"
ORIGIN
     1 cattgaaatc ctgactgacg tgcaactgat caagactgga gacaaagtgg gagccagcga
     61 agccacattg ctgaacatgc tgaacatctc cccattctcc tttgggctga tcattcagca
     121 ggtgtttgac aacggcagca tctacaaccc tgaatg
//

```

Para el protocolo de corrida se siguieron los parámetros recomendados por el kit “LightCycler®480DNA Master SYBR Green I” (Roche), con una temperatura de hibridación de 60 °C por 10 segundos (Tabla 07).

Tabla 07. Temperaturas y ciclos empleados para cuantificación relativa por RT-qPCR en tiempo real.

Formato de detección	Tipo de bloque	Volumen de reacción		
SYBR Green	96	20 µl		
Programas				
Nombre	Ciclos	Modo de análisis		
Pre-Incubación	01	Ninguno		
Amplificación	45	Cuantificación		
Curva de denaturación	01	Curvas de denaturación		
Enfriamiento	01	Ninguno		
Temperaturas blanco				
Blanco (°C)	Modo de adquisición	Mantenimiento (hh:mm:ss)	Tasa de rampa (°C)	Adquisición (por °C)
Pre-Incubación				
95	Ninguno	00:05:00	4.4	-----
Amplificación				
95	Ninguno	00:00:10	4.4	-----
60	Ninguno	00:00:10	2.2	-----
72	Simple	00:00:10	4.4	-----
Curva de denaturación				
95	Ninguno	00:00:05	4.4	-----
65	Ninguno	00:01:00	2.2	-----
97	Continuo	-----	----	05
Enfriamiento				
40	Ninguno	00:00:10	1.5	-----

El análisis se realizó mediante el paquete libre LinRegPCR (<http://www.gene-quantification.de/LinRegPCR.zip>) (Ramakers *et al.*, 2003). Este programa permite por medio de la transformación logarítmica de los datos crudos de la amplificación (ciclos vs fluorescencia), establecer una zona en la curva denominada “ventana de linealidad” la cual es analizable por regresión lineal. Partiendo de esta imagen es posible deducir principalmente dos cosas: 1) “la eficiencia de la amplificación”, obviando la necesidad de elaborar curvas de estandarización, que podrían dar apreciaciones sesgadas (Ruijter *et al.*, 2009), ser costosas y por lo tanto inviables para el presente proyecto por el monto a invertir por muestra a ser analizada y para cada uno de los genes; y 2) finalmente, “la fluorescencia que tendría el transcrito inicial (cDNA)”, lo cual permitiría tener comparaciones válidas para cada individuo y gen problema. Las réplicas técnicas fueron promediadas y normalizadas con el promedio de las réplicas técnicas del gen control.

Se exploraron las posibles correlaciones entre las expresiones normalizadas de los genes problema contra los parámetros fisiológicos, mediante la prueba no paramétrica de Spearman (se asumió una no normalidad de las expresiones relativas, normalizadas de genes).

4.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el paquete IBM SPSS Statistics v19.0, en el cual se utilizó la prueba de análisis de correlación de Spearman entre la variable expresión de la *CCNA1*, versus la variable fisiológica concentración espermática. Los valores $p < 0,05$ y $p < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativos respectivamente.

El test de Spearman es una versión no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson, que se basa en los rangos de los datos en lugar de hacerlo en los valores reales. Resulta apropiada para datos ordinales (susceptibles de ser ordenador) y para datos agrupados en intervalos que no satisfagan el supuesto de normalidad. Los valores del coeficiente varían de -

1 a + 1. El signo del coeficiente indica la dirección de la relación y el valor absoluto del coeficiente de correlación indica la fuerza de la relación entre las variables. Los valores absolutos mayores indican que la relación es mayor (UCLM, 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados fisiológicos.

Los resultados de los análisis fisiológicos y moleculares en detalle se observan en las siguientes tablas:

Tabla 08. Cuadro resumen de los resultados de análisis fisiológicos y moleculares expresados en Promedio (con desviación estándar), Media y Moda.

Parámetro Reproductivo n=35		Promedio	Media	Moda
Expresión Relativa de <i>CCNA1</i>		4.59 ± 1.97	4.37	6.35
Concentración (spz x 10 ⁶ /ml)		89.34 ± 95.18	48.90	10.80
Movilidad (%)	a	7.25 ± 10.93	2.49	0.00
	b	11.94 ± 12.79	6.15	0.00
	(a+b)	19.18 ± 19.09	11.00	0.00
Vitalidad (%)		81.74 ± 8.11	85.00	85.00
Integridad de membrana (%)		15.20 ± 2.96	14.90	15.30

spz x 10⁶/ml: Espermatozoides por millón en un mililitro de machacado epididimario.

Proporción de la concentración espermática

- Más de 20 millones de espermatozoides por ml.
- Menos de 20 millones de espermatozoides por ml.

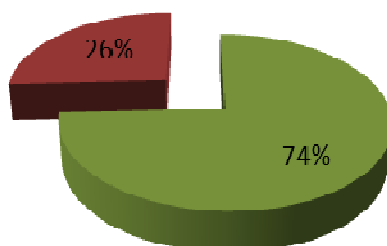


Figura 24. Proporción de la concentración espermática de las muestras evaluadas. Considerando parámetros establecidos por la OMS para humanos.

5.2. Resultado del secuenciamiento y análisis *in silico* de productos de PCR.

Tabla 09. Alineamiento local usando la herramienta BLAST de la secuencia “*Lama pacos* cyclin A1 mRNA, partial cds” (GQ438258.1) de 289 pb.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XM_003361770.2	PREDICTED: Sus scrofa cyclin-A1-like (LOC100627814), partial m	430	430	99%	3e-118	93%
XM_600212.5	PREDICTED: Bos taurus cyclin A1 (CCNA1), mRNA >ref XM_002691	423	423	100%	5e-116	92%
XM_001928250.1	PREDICTED: Sus scrofa cyclin A1 (CCNA1), mRNA	423	423	100%	5e-116	92%
XM_002928789.1	PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca cyclin-A1-like (LOC10047518	416	416	99%	7e-114	92%
XM_534494.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris cyclin A1 (CCNA1), mRNA	408	408	100%	1e-111	91%
XM_001915907.1	PREDICTED: Equus caballus cyclin-A1-like (LOC100147188), mRN	399	399	100%	6e-109	91%
XM_003826886.1	PREDICTED: Pan paniscus cyclin A1, transcript variant 2 (CCNA1),	379	379	99%	5e-103	89%
XM_003826885.1	PREDICTED: Pan paniscus cyclin A1, transcript variant 1 (CCNA1),	379	379	99%	5e-103	89%
XM_002824174.2	PREDICTED: Pongo abelii cyclin A1 (CCNA1), mRNA	379	379	99%	5e-103	89%
NM_001246437.1	Pan troglodytes cyclin A1 (CCNA1), mRNA >dbj AK305622.1 Pan t	379	379	99%	5e-103	89%
NM_001111047.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 4, mRNA	379	379	99%	5e-103	89%
NM_001111046.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 3, mRNA	379	379	99%	5e-103	89%
NM_001111045.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 2, mRNA	379	379	99%	5e-103	89%
NM_003914.3	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 1, mRNA	379	379	99%	5e-103	89%
XM_003409628.1	PREDICTED: Loxodonta africana cyclin A1 (CCNA1), mRNA	372	372	100%	8e-101	89%
XM_003913768.1	PREDICTED: Papio anubis cyclin A1, transcript variant 2 (CCNA1),	370	370	99%	3e-100	89%
XM_003913767.1	PREDICTED: Papio anubis cyclin A1, transcript variant 1 (CCNA1),	370	370	99%	3e-100	89%
XM_003803103.1	PREDICTED: Otomlemur garnettii cyclin-A1-like (LOC100942167), m	370	370	99%	3e-100	89%
XM_003934424.1	PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis cyclin A1, transcript vari	369	369	100%	1e-99	88%
XM_003934423.1	PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis cyclin A1, transcript vari	369	369	100%	1e-99	88%
XM_002749012.1	PREDICTED: Callithrix jacchus cyclin A1 (CCNA1), mRNA	369	369	100%	1e-99	88%
XM_001084161.2	PREDICTED: Macaca mulatta cyclin A1, transcript variant 5 (CCNA1	367	367	99%	3e-99	88%
XM_001084034.2	PREDICTED: Macaca mulatta cyclin A1, transcript variant 4 (CCNA1	367	367	99%	3e-99	88%
XM_002720587.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cyclin A1 (LOC100358389), mR	367	367	99%	3e-99	88%
XM_003282219.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 3 (352	352	99%	7e-95	87%
XM_003282218.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 2 (352	352	99%	7e-95	87%
XM_003282217.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 1 (352	352	99%	7e-95	87%
XM_001377488.1	PREDICTED: Monodelphis domestica cyclin A1 (CCNA1), mRNA	351	351	100%	3e-94	87%
XM_003472727.1	PREDICTED: Cavia porcellus cyclin A1 (Ccna1), mRNA	342	342	100%	1e-91	86%
NM_001011949.1	Rattus norvegicus cyclin A1 (Ccna1), mRNA >gb BC079234.1 Rat	342	342	99%	1e-91	86%
NM_007628.3	Mus musculus cyclin A1 (Ccna1), mRNA	333	333	99%	7e-89	86%
XM_003764521.1	PREDICTED: Sarcophilus harrisii cyclin A1 (CCNA1), mRNA	324	324	100%	4e-86	85%
XM_003502960.1	PREDICTED: Cricetulus griseus cyclin-A1-like (LOC100769969), m	320	320	99%	4e-85	85%
XM_001511529.1	PREDICTED: Ornithorhynchus anatinus cyclin-A1-like (LOC100080	306	306	100%	1e-80	83%
XM_417097.3	PREDICTED: Gallus gallus cyclin A1 (CCNA1), mRNA	297	297	99%	5e-78	83%

Tabla 10. Accesoión GQ438258.1 correspondiente al amplicón del gen *CCNA1* que se evaluó mediante RT-qPCR.

Lama pacos cyclin A1 mRNA, partial cds

GenBank: GQ438258.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

```

LOCUS       GQ438258                289 bp    mRNA    linear    MAM 22-SEP-2009
DEFINITION  Lama pacos cyclin A1 mRNA, partial cds.
ACCESSION   GQ438258
VERSION     GQ438258.1  GI:258617810
KEYWORDS    .
SOURCE      Vicugna pacos (alpaca)
  ORGANISM  Vicugna pacos
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
            Camelidae; Vicugna.
REFERENCE   1 (bases 1 to 289)
  AUTHORS   Tataje Lavanda, L.A., Canorio Pariona, N.M., Florentini
            Carranza, E.A., Llerena Vargas, E.M. and Valdivia Cuya, M.E.
  TITLE     Molecular characterization of cyclin A1 in alpaca
  JOURNAL    Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 289)
  AUTHORS   Tataje Lavanda, L.A., Canorio Pariona, N.M., Florentini
            Carranza, E.A., Guzman Masias, L.A., Llerena Vargas, E.M., Vidal, F.
            and Valdivia Cuya, M.E.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL    Submitted (31-JUL-2009) Laboratorio de Fisiología de la
            Reproducción Animal (LFRA), Universidad Nacional Mayor de San
            Marcos (UNMSM), Av. Venezuela Cdra. 34/Av. Universitaria-Facultad de
            Ciencias Biológicas, Lima, Peru
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..289
                     /organism="Vicugna pacos"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:30538"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="testis"
                     /note="PCR primers=fwd_name: F-ciclina A1, rev_name:
                     R-ciclina A1"
     CDS               1..289
                     /note="CCNA1; cyclin box fold; protein binding domain
                     functioning in cell-cycle and transcription control"
                     /codon_start=2
                     /product="cyclin A1"
                     /protein_id="ACV83922.1"
                     /db_xref="GI:258617811"
                     /translation="LAVNFLDRFLSCMSVLRGKLQVGTAAILLASKYEEIYPPEVDE
                     FVYITDDTYIKRQLLRMEHLLKVLAFDLTVPTTNQFLQLYLRQGVQVCRTE"
ORIGIN
1  cctggccgctc aacttctctg acaggttctc gtcgtgcatg tctgttctga gagggaaact
61  gcagctcgta ggaacggcag ctattctgct ggcttcgaaa tatgaagaaa tataccacc
121  agaagtagac gagtttctct acataaccga tgacacttac acaaaacgac aactgctgag
181  aatggaacac ctgctctctg aggtctctgc ttttgatctg acggtgccaa ccaccaacca
241  gtttctctct cagtacttac ggaggcaggg agtgtgcgtc aggactgag
//

```


Tabla 11. Alineamiento local usando la herramienta BLAST de secuencia
 “*Lama pacos* cyclin A1 (*CCNA1*) mRNA, partial cds” (HQ450519.1) de
 115pb.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XM_003502960.1	PREDICTED: Cricetulus griseus cyclin-A1-like (LOC100769969), m	159	159	100%	3e-37	91%
XM_600212.5	PREDICTED: Bos taurus cyclin A1 (CCNA1), mRNA >ref XM_00269	150	150	100%	2e-34	89%
XM_534494.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris cyclin A1 (CCNA1), mRNA	150	150	100%	2e-34	89%
XM_002928789.1	PREDICTED: Alluopoda melanoleuca cyclin-A1-like (LOC10047518	150	150	100%	2e-34	89%
NM_001246437.1	Pan troglodytes cyclin A1 (CCNA1), mRNA >dbj AK305622.1 Pan t	147	147	92%	2e-33	91%
XM_002720587.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cyclin A1 (LOC100358389), mR	145	145	100%	6e-33	88%
XM_003934424.1	PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis cyclin A1, transcript vari	141	141	100%	8e-32	87%
XM_003934423.1	PREDICTED: Saimiri boliviensis boliviensis cyclin A1, transcript vari	141	141	100%	8e-32	87%
XM_003826886.1	PREDICTED: Pan paniscus cyclin A1, transcript variant 2 (CCNA1),	141	141	92%	8e-32	90%
XM_003826885.1	PREDICTED: Pan paniscus cyclin A1, transcript variant 1 (CCNA1),	141	141	92%	8e-32	90%
XM_002824174.2	PREDICTED: Pongo abelii cyclin A1 (CCNA1), mRNA	141	141	92%	8e-32	90%
XM_001084161.2	PREDICTED: Macaca mulatta cyclin A1, transcript variant 5 (CCNA1	141	141	92%	8e-32	90%
XM_001084034.2	PREDICTED: Macaca mulatta cyclin A1, transcript variant 4 (CCNA1	141	141	92%	8e-32	90%
XM_001928250.1	PREDICTED: Sus scrofa cyclin A1 (CCNA1), mRNA	141	141	95%	8e-32	88%
NM_001111047.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 4, mRNA	141	141	92%	8e-32	90%
NM_001111046.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 3, mRNA	141	141	92%	8e-32	90%
NM_001111045.1	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 2, mRNA	141	141	92%	8e-32	90%
NM_003914.3	Homo sapiens cyclin A1 (CCNA1), transcript variant 1, mRNA	141	141	92%	8e-32	90%
NM_001011949.1	Rattus norvegicus cyclin A1 (Ccna1), mRNA >gb BC079234.1 Rat	141	141	100%	8e-32	87%
XM_003913768.1	PREDICTED: Papio anubis cyclin A1, transcript variant 2 (CCNA1),	138	138	92%	1e-30	89%
XM_003913767.1	PREDICTED: Papio anubis cyclin A1, transcript variant 1 (CCNA1),	138	138	92%	1e-30	89%
NM_007628.3	Mus musculus cyclin A1 (Ccna1), mRNA	136	136	100%	3e-30	86%
XM_003803103.1	PREDICTED: Otolemur garnettii cyclin-A1-like (LOC100942167), m	132	132	100%	4e-29	85%
XM_003409628.1	PREDICTED: Loxodonta africana cyclin A1 (CCNA1), mRNA	132	132	95%	4e-29	87%
XM_003282219.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 3 (132	132	92%	4e-29	88%
XM_003282218.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 2 (132	132	92%	4e-29	88%
XM_003282217.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys cyclin A1, transcript variant 1 (132	132	92%	4e-29	88%
XM_001915907.1	PREDICTED: Equus caballus cyclin-A1-like (LOC100147188), mRN	132	132	100%	4e-29	85%
XM_003477273.1	PREDICTED: Cavia porcellus cyclin A1 (Ccna1), mRNA	127	127	100%	2e-27	85%

Tabla 12. Acceso HQ450519.1 correspondiente al segundo amplicón del gen *CCNA1* que se evaluó mediante RT-qPCR.

Lama pacos cyclin A1 (ccna1) mRNA, partial cds

GenBank: HQ450519.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) 

```

LOCUS      HQ450519                115 bp    mRNA    linear    MAM 11-DEC-2010
DEFINITION Lama pacos cyclin A1 (ccna1) mRNA, partial cds.
ACCESSION  HQ450519
VERSION    HQ450519.1  GI:313587213
KEYWORDS   .
SOURCE     Vicugna pacos (alpaca)
  ORGANISM Vicugna pacos
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
            Camelidae; Vicugna.
REFERENCE  1 (bases 1 to 115)
AUTHORS   Tataje Lavanda, L.A., Vasquez Caverio, J.H., Florentini Carranza, E.A.,
            Canorio Pariona, N.M. and Valdivia Cuya, M.E.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (28-OCT-2010) Laboratorio de Fisiología de la
            Reproducción Animal (LFRA), Universidad Nacional Mayor de San
            Marcos (UNMSM), Av. Venezuela Cdra.34/Av. Universitaria-Facultad de
            Ciencias Biológicas, Lima, Peru
FEATURES   Location/Qualifiers
     source          1..115
                     /organism="Vicugna pacos"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:30538"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="testis"
                     /PCR_primers="fwd_name: Fccna1(942-963), fwd_seq:
cattaagtgaattgtgccc, rev_name: Rccna1(1036-1056)EE,
                     rev_seq: acacgtgcatactttgaagtc"
     gene            <1..>115
                     /gene="ccna1"
     CDS             <1..>115
                     /gene="ccna1"
                     /codon_start=3
                     /product="cyclin A1"
                     /protein_id="ADR71514.1"
                     /db_xref="GI:313587214"
                     /translation="LSEIVPCLSELHKACLVIPHRPQQAIRESKYKTSKYARV"
ORIGIN
     1 cattaagtga aattgtgccc tgccgtgagtg agctacataa agcgtgccc gttatacccc
    61 accggcccca gcaagcaatc agggagaagt ataagacttc aaagtatgca cgtgt
//

```

Tabla 13. Resultados de análisis fisiológicos y moleculares considerados en el presente estudio.

Individuos		PARAMETROS MOLECULARES	PARAMETROS FISIOLÓGICOS					
		Expresión Relativa de <i>CCNA1</i>	Conc.	Motilidad (%)			Vitalidad	Integridad de Membrana (Fragmentados)
				1E6 / ml	a	b		
1	10-28T;E	7.63	330.00	2.31	28.46	30.77	80.00	17.10
2	10-39T;E	7.22	303.00	2.49	2.99	5.47	75.00	13.90
3	10-43T;E	8.51	284.00	2.00	3.00	5.00	91.00	15.90
4	10-24T;E	8.33	276.10	15.00	35.00	50.00	90.00	19.30
5	10-45T;E	2.73	208.00	4.24	6.36	10.60	73.00	13.60
6	10-41T;E	5.77	190.00	0.00	2.00	2.00	85.00	11.60
7	10-14T;E	6.35	178.60	8.80	3.00	11.80	78.60	15.40
8	10-50T;E	3.60	168.00	0.77	6.15	6.92	91.00	17.90
9	10-34T;E	4.37	166.25	1.85	1.85	3.70	86.00	17.10
10	10-23T;E	5.03	99.60	3.00	8.00	11.00	90.00	20.20
11	10-42T;E	7.39	96.00	1.41	7.75	9.15	86.00	14.70
12	10-08T;E	3.09	85.60	7.70	26.15	33.85	89.57	12.50
13	10-09T;E	3.50	75.20	3.24	5.23	8.47	70.59	15.30
14	10-36T;E	5.03	72.50	1.75	6.14	7.89	90.00	15.10
15	10-22T;E	4.15	65.80	5.00	2.00	7.00	65.00	20.80
16	10-02T;E	3.56	58.00	33.79	6.08	39.87	69.17	13.20
17	10-29T;E	4.26	55.00	0.00	3.00	3.00	80.00	14.30
18	10-01T;E	2.06	48.90	2.00	14.00	16.00	88.52	17.60
19	10-30T;E	4.96	45.00	24.62	7.69	32.31	90.00	9.60
20	10-21T;E	2.03	43.70	3.00	37.00	40.00	80.00	14.10
21	10-03T;E	2.52	41.00	37.71	9.51	47.22	71.68	16.00
22	10-04T;E	4.33	40.00	2.00	30.00	32.00	91.33	18.20
23	10-44T;E	2.48	35.00	10.64	5.32	15.96	76.00	9.40
24	10-51T;E	3.22	32.80	2.08	25.00	27.08	85.00	14.30
25	10-46T;E	4.71	31.00	3.52	23.24	26.76	86.00	14.90
26	10-17T;E	5.84	30.20	1.38	2.55	3.93	74.30	
27	10-33T;E	6.99	18.00	0.00	0.93	0.93	80.00	18.30
28	10-05T;E	1.34	10.80	4.77	21.43	26.20	80.65	8.90
29	10-31T;E	5.71	10.80	1.16	0.00	1.16	85.00	15.30
30	10-40T;E	5.23	9.60	0.00	0.00	0.00	76.00	13.60
31	10-49T;E	6.35	8.90	0.00	0.00	0.00	92.00	
32	10-12T;E	2.43	4.50	21.54	8.46	30.00	85.95	20.20
33	10-13T;E	5.67	3.40	0.00	1.97	1.97	82.90	14.70
34	10-10T;E	2.93	1.20	40.18	46.43	86.61	60.71	14.60
35	10-11T;E	1.46	0.50	5.66	31.13	36.79	85.00	13.90
	Más de 20 millones de espermatozoides por ml.							
	Menos de 20 millones de espermatozoides por ml.							

5.3. Análisis estadísticos

A continuación se enlistan los gráficos de dispersión correspondientes a los niveles de expresión de *CCNA1* versus los parámetros fisiológicos analizados:

Tabla 14. Cuadro resumen de la Expresión relativa de *CCNA1* (normalizado con el gen RPL0) versus la concentración espermática dividida en dos grupos según la OMS.

Tabla 15. Cuadro resumen de la Expresión relativa de *CCNA1* (normalizado con el gen RPL0) versus variables fisiológicas y su análisis por test de correlación de Spearman.

Figura 25. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Concentración Espermática (spz x 10⁶/ml).

Figura 26. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Movilidad a%.

Figura 27. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Movilidad b%

Figura 28. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Movilidad a+b

Figura 29. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Vitalidad %.

Figura 30. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Prueba Hipoosmótica (HOS test)

Figura 31. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Concentración Espermática por encima de los 20 millones de espermatozoides/ml.

Figura 32. Niveles de expresión de *CCNA1* versus Concentración Espermática por debajo de los 20 millones de espermatozoides/ml.

Tabla 13. Cuadro resumen de la Expresión relativa de *CCNA1* (normalizado con el gen *RPL0*) versus las distintas pruebas fisiológicas evaluadas. Test de Correlación de Spearman: Muestra asociación leve pero significativa.

Rho de Spearman	Expresión Relativa de <i>CCNA1</i>		
	Coeficiente de Correlación	Prueba de significación bilateral	Datos
	(r)	(p)	(N)
Concentración espermática (mill/ml)	0.398*	0.018	35
Movilidad: a%	-0.452**	0.006	35
Movilidad: b%	-0.448**	0.007	35
Movilidad: (a+b)	-0.477**	0.004	35
Vitalidad (%)	0.237	0.171	35
Espermatozoides Fragmentados (%)	0.259	0.146	33

* La correlación es significativa al nivel 0.05 (Prueba de significación bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (Prueba de significación bilateral)

Tabla 14. Cuadro resumen de la Expresión relativa de *CCNA1* (normalizado con el gen RPL0) versus la concentración espermática dividida en dos grupos según la OMS.

Rho de Spearman	Expresión Relativa de <i>CCNA1</i>		
	Coeficiente de Correlación	Prueba de significación bilateral	Datos
	(r)	(p)	(N)
Concentración espermática (mill/ml) de muestras por debajo de 20 millones de espermatozoides.	0.435	0.242	9
Concentración espermática (mill/ml) de muestras por encima de 20 millones de espermatozoides.	0.531**	0.005	26

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (Prueba de significación bilateral)

Según la OMS, se considera en un espermatograma para humanos es aceptable a partir de 20 millones de espermatozoides por ml. El test de Correlación de Spearman muestra asociación significativa.

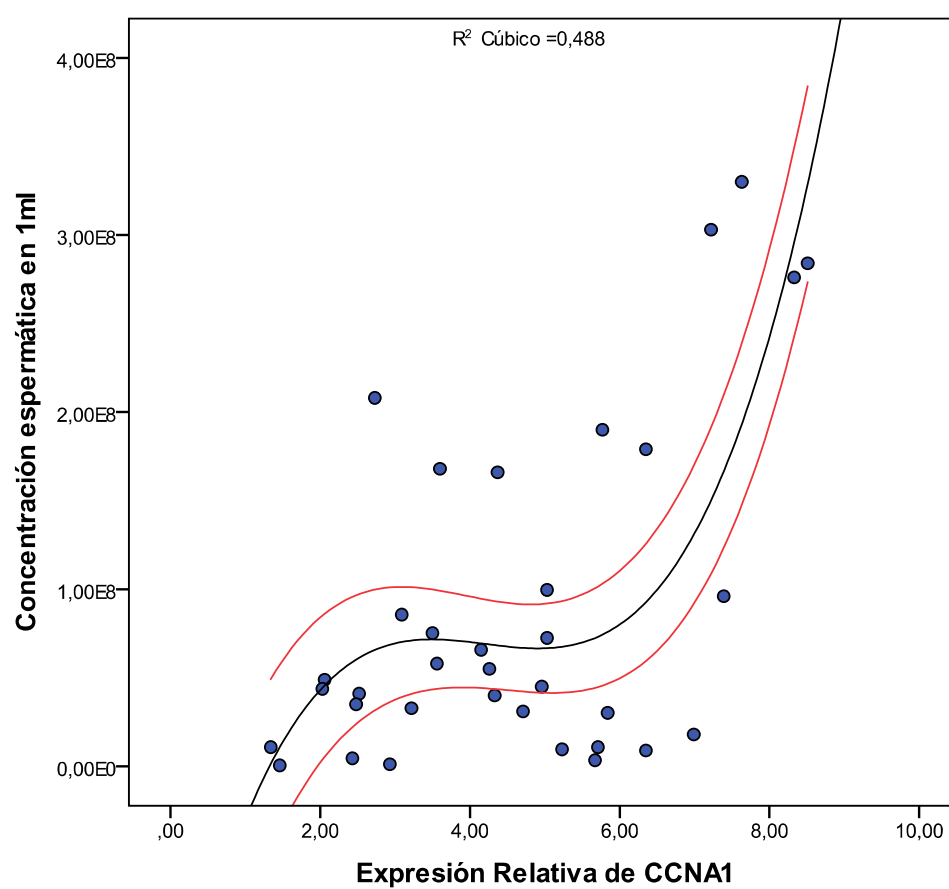


Figura 25. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Concentración espermática” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

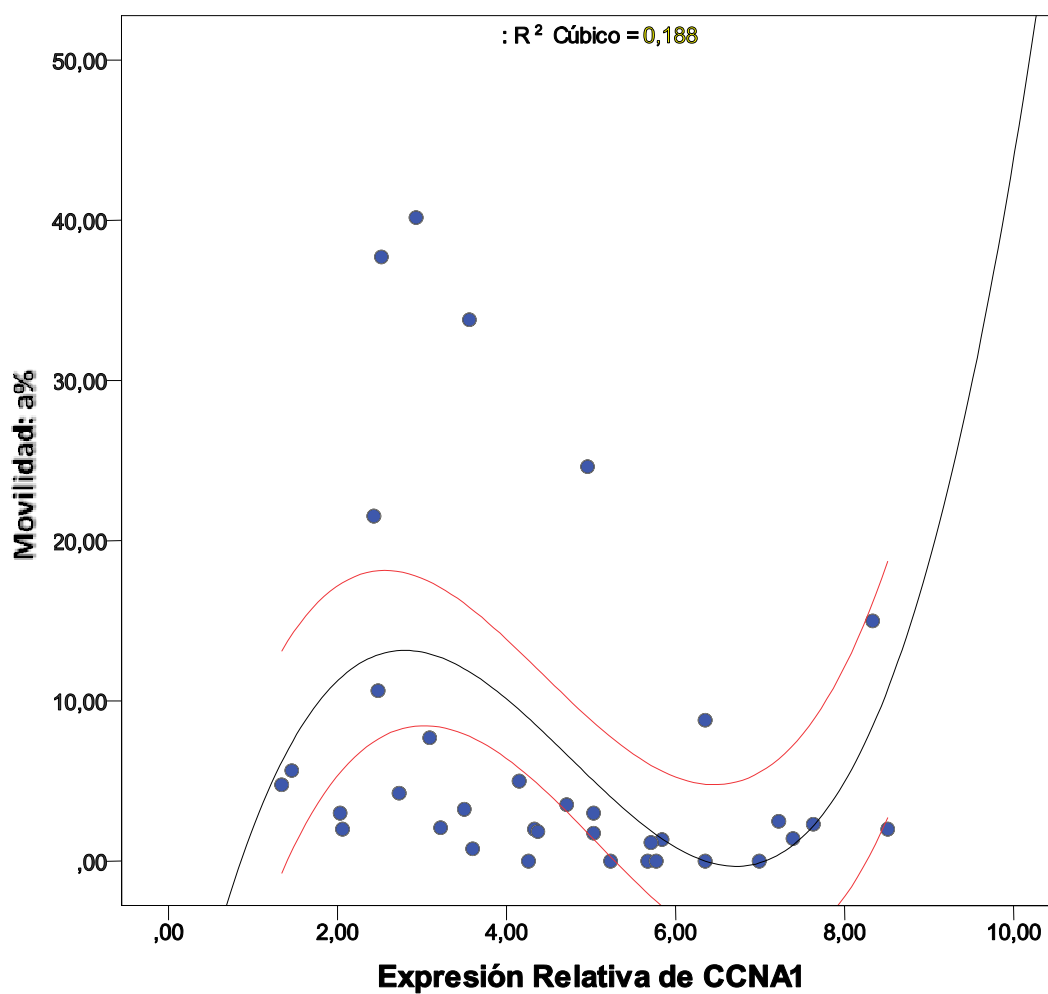


Figura 26. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Movilidad: a%” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

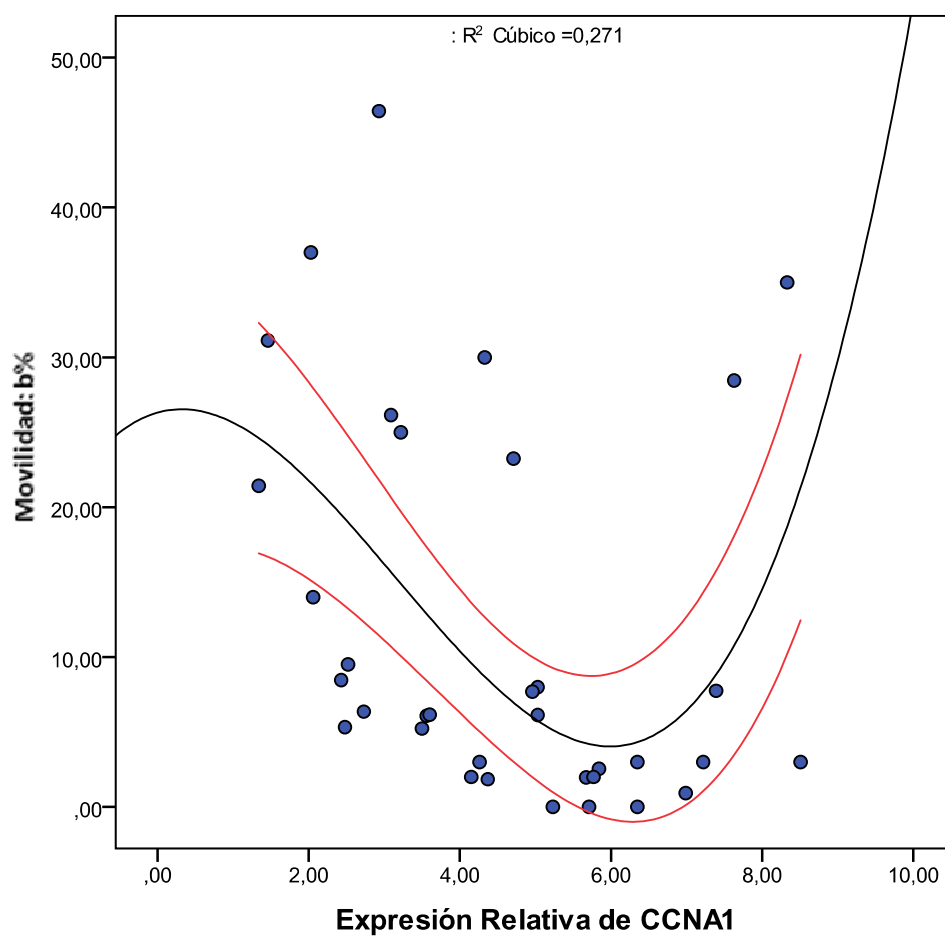


Figura 27. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Movilidad: b%” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

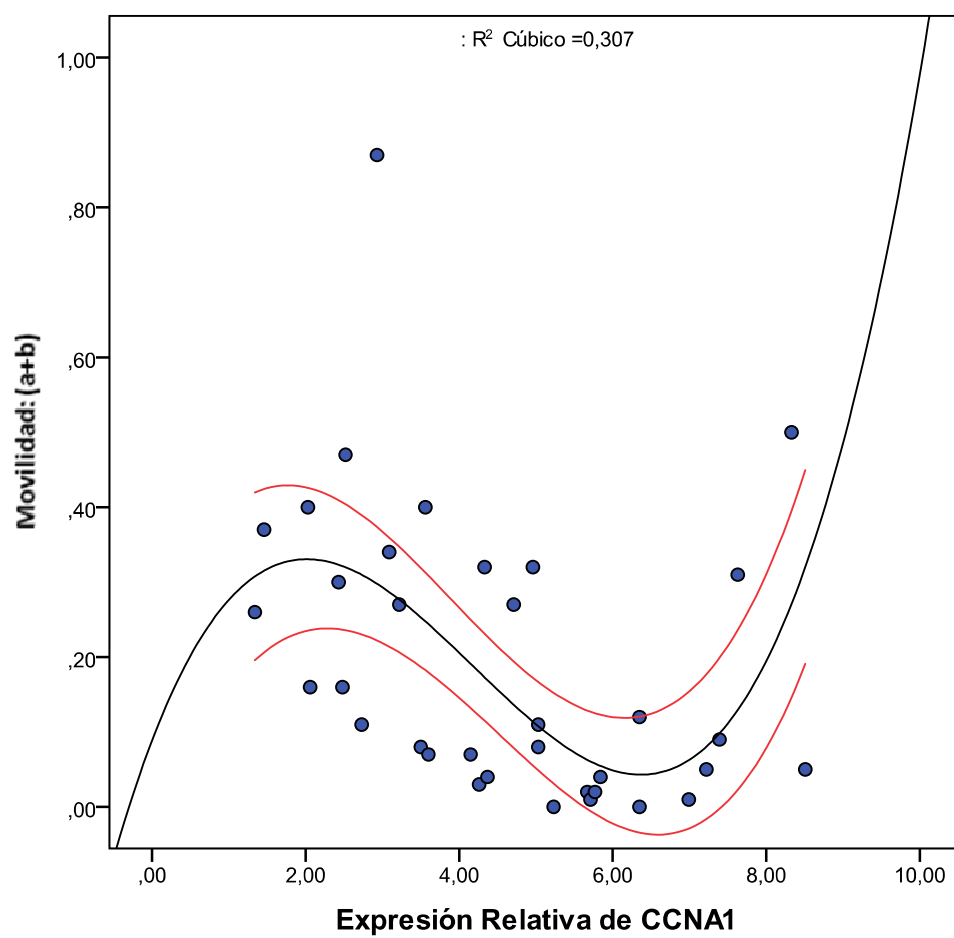


Figura 28. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Motilidad: (a+b)” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

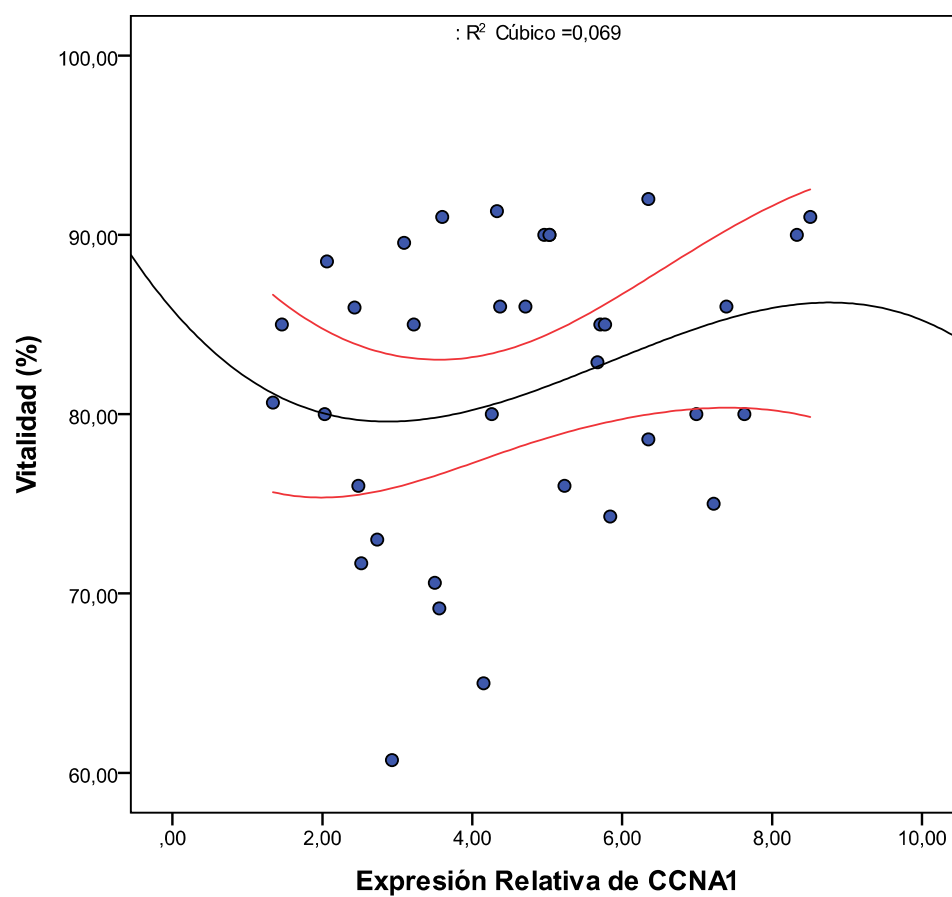


Figura 29. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Vitalidad (%)” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

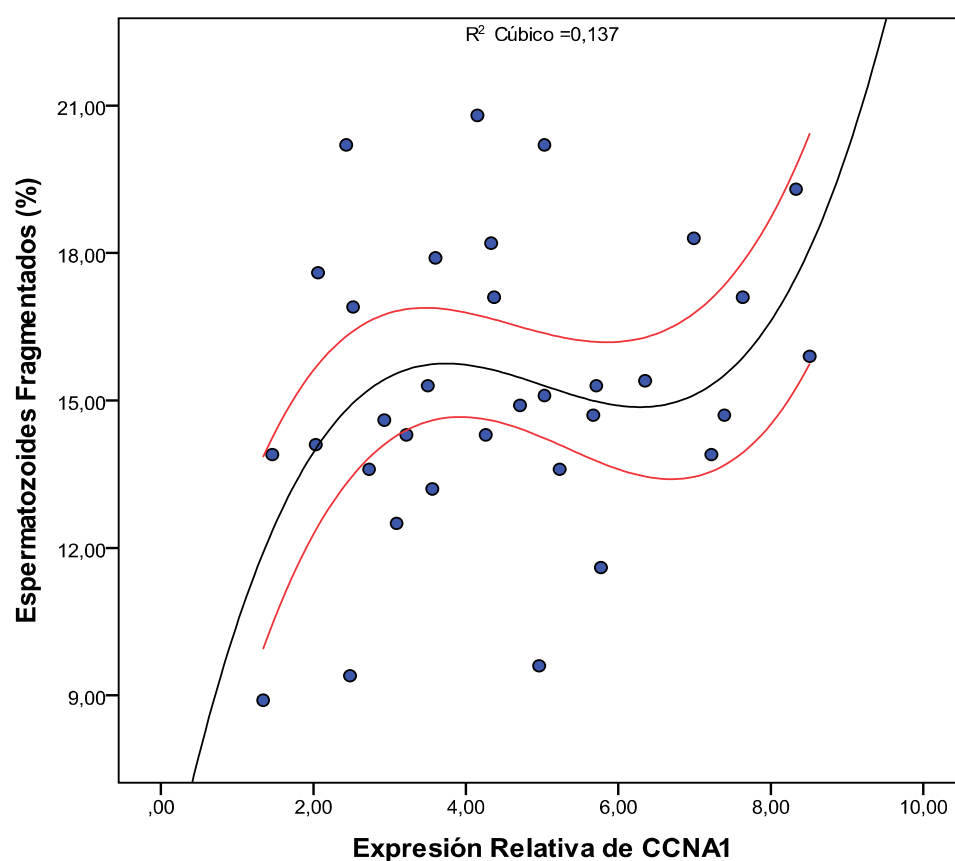


Figura 30. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Espermatozoides fragmentados” vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

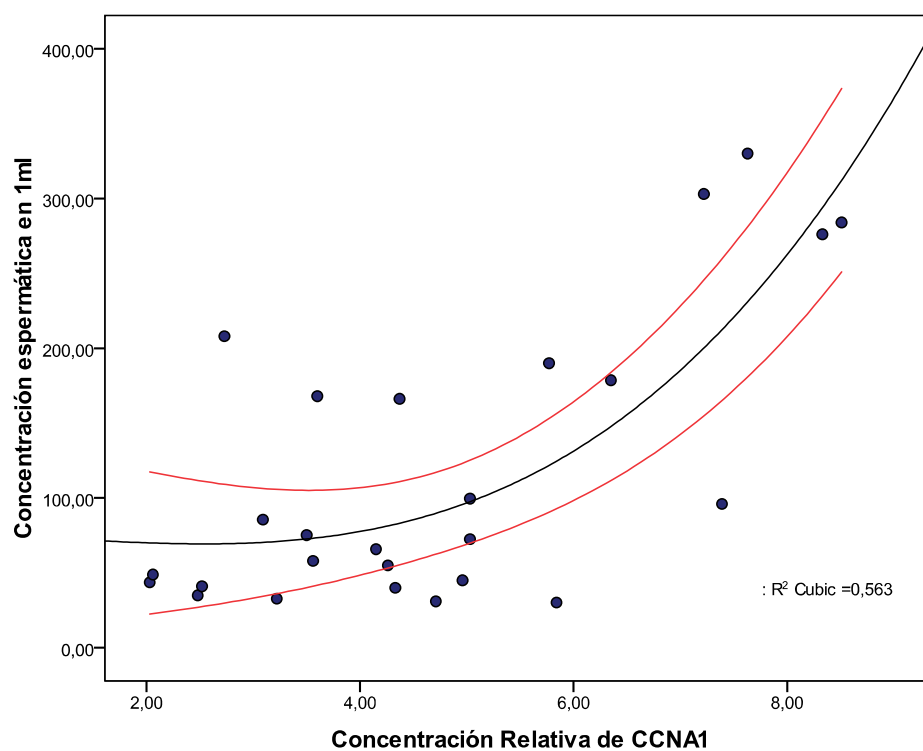


Figura 31. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Concentración espermática” por encima de los 20 millones de espermatozoides por ml (establecido por la OMS para humanos) vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

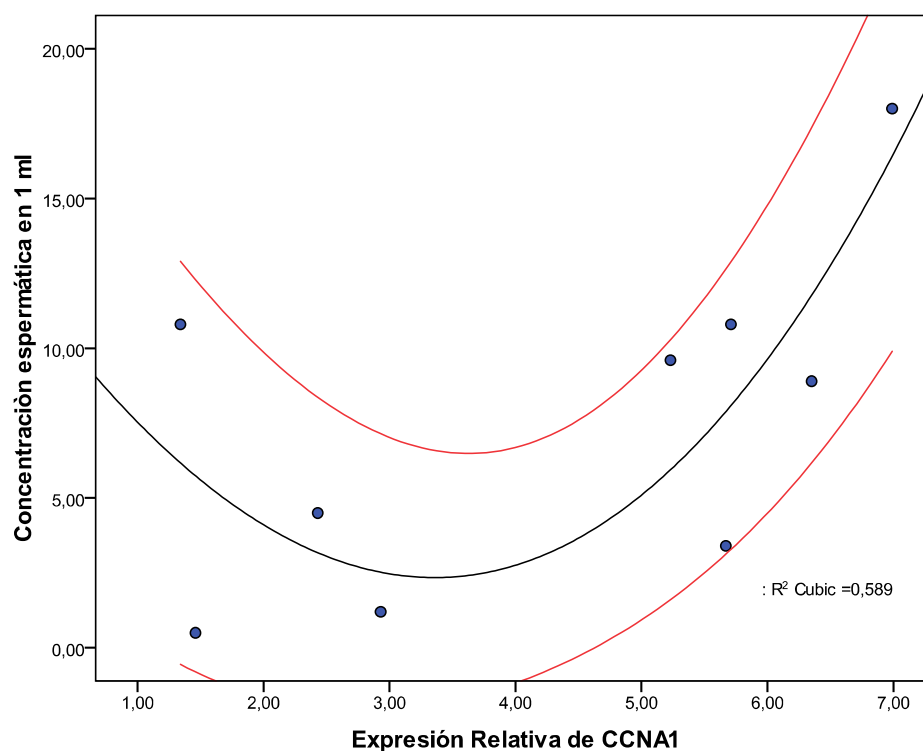


Figura 32. Diagrama de dispersión mostrando la variable fisiológica “Concentración espermática” por debajo de los 20 millones de espermatozoides por ml (establecido por la OMS para humanos) vs “Expresión del gen *CCNA1*” en tejido testicular de alpaca.

6. DISCUSIÓN

Basados en estudios previos donde se ha demostrado la importancia de la *CCNA1* en la espermatogénesis (Sweenwey et al., 1996; Yang *et al.*, 1997, Liu D *et al.*, 1998, 2000; Ravnik y Wolgemuth, 1999; Wolgwmuth *et al.*, 2002), e inmersos en el proyecto de buscar un grupo de genes que potencialmente ayuden a predecir el potencial reproductivo de las alpacas machos, la presente investigación es la primera en cuantificar la expresión de mRNA de *CCNA1* en alpacas (*Lama pacos*) y correlacionarla con diversos parámetros fisiológicos. Para tal fin, se han empleado biopsias testiculares y espermatozoides epididimarios de alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Huancavelica, dado que no es viable el manejo y hospedaje de animales para dicho fin. Durante la colecta de muestras se encontró gran número de animales que presentaban malformaciones testiculares, o ausencia de testículos porque los criadores previamente les han extirpado para evitar perpetuar características no deseadas en su ganado. Estas y otras malformaciones son evaluadas *post mortem* de manera rutinaria por el veterinario de turno del Camal Municipal de Huancavelica.

Ayudados del veterinario del camal, las alpacas incluidas en este estudio no presentaron malformaciones anátomo-patológica testicular, presentaban un potencial fertilizante tangible y madurez sexual (Sumar, 1983; Bravo *et al.*, 1997).

Las muestras seleccionadas fueron separadas en grupos de investigación para su rápida evaluación de parámetros reproductivos de concentración, movilidad, vitalidad e integridad de membrana.

El análisis bioinformático de los productos de PCR secuenciados corroboró la conservación del gen de la *CCNA1* y su transcripto, se sugiere con esto la existencia en alpaca de una ciclina similar a la *CCNA1*, de manera similar se

ha reportado el gen de la ciclina A1 en otras especies animales (Tataje, 2010) (Figura 33), que se encuentra ubicada en biopsias testiculares de alpacas.

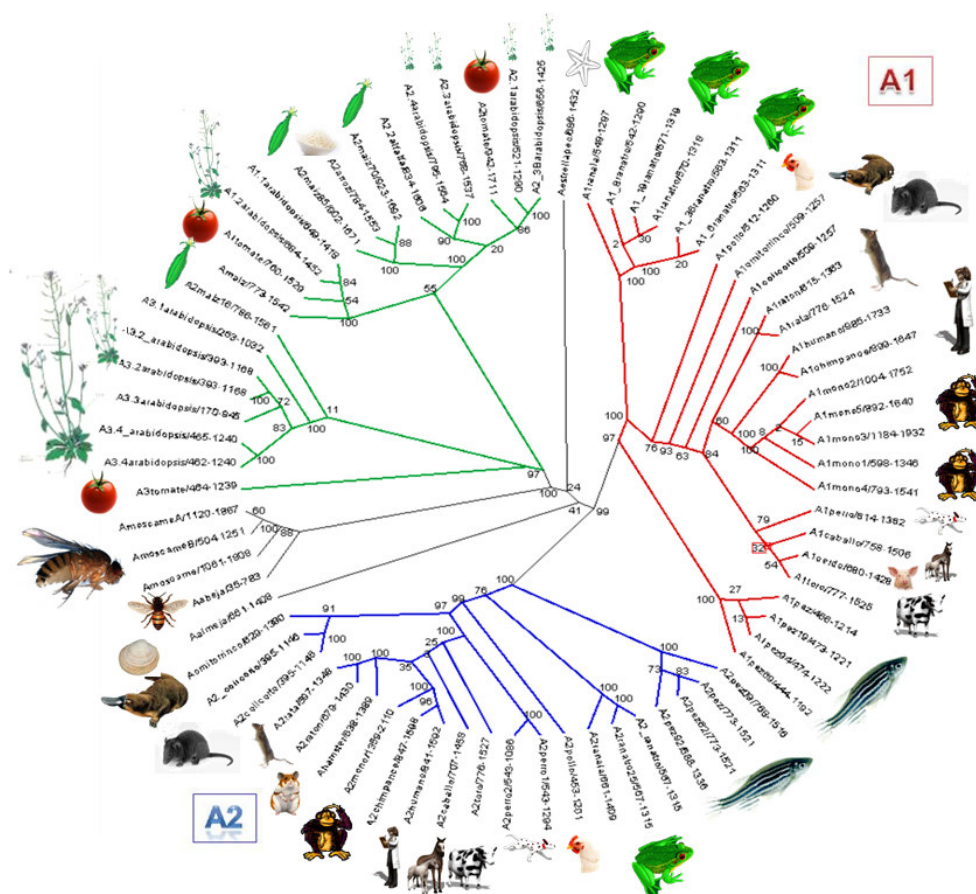


Figura 33. Árbol filogenético por el método de Maximum-Likelihood (Máxima verosimilitud). Con un bootstrap de 100 repeticiones y sin raíz usando las secuencias nucleotídicas de las ciclinas tipo A con valores bootstrap. A1: Ciclitas A1 en rojo, A2: ciclitas A2 en azul, ciclitas A1-A3 de plantas en verde (Tataje, 2010).

Los análisis estadísticos se realizaron tomando dos criterios diferentes. El primer enfoque fue realizar correlaciones sin subdividir las 35 muestras, evitando cualquier sesgo, debido a que no se han establecido a la fecha los parámetros y rangos aceptables para una adecuada fertilidad en alpaca. Del análisis de correlación de la cuantificación relativa de *CCNA1* versus las distintas variables fisiológicas evaluadas, se apreció asociación baja pero significativa con la variable “Concentración espermática” con un coeficiente

Rho de 0.3989 ($p < 0.05$), estos resultados sugieren que la función del *CCNA1* en artiodáctilos (alpacas) parece haberse conservado, esto corrobora que la maquinaria de replicación celular se encuentra muy bien conservada en la naturaleza, como genes y como proteínas accesorias; por tanto se podrían extrapolar los estudios de fertilidad en humano basados en el marcador molecular *CCNA1*. Entonces podríamos esperar baja producción de espermatozoides debido a una pobre expresión de la *CCNA1*, dado que habrían alteraciones durante la primera división meiótica (Sweeney *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Wolgemuth *et al.*, 2002). Sin embargo, se necesitarán más estudios para definir las regiones específicas en el testículo en cuanto a su expresión. Adicionalmente, se encontró una correlación negativa baja de la expresión de la *CCNA1* con la movilidad, con un Rho de -0.452 ($p < 0.01$) para movilidad a, -0.448 ($p < 0.01$) para movilidad b y -0.477 ($p < 0.01$) para movilidad a+b. Estas variables podrían estar influenciadas en mayor medida por otros mecanismos moleculares que no fueron objetivo de estudio en la presente tesis.

El segundo enfoque fue correlacionar los datos dividiendo las muestras en dos grupos de acuerdo a la concentración espermática: “Menos de 20 millones de espermatozoides por ml” y “Mayor de 20 millones por ml”. Esta división es acorde a los criterios de la OMS para humanos. Del análisis de correlación de la cuantificación relativa de *CCNA1* *versus* estos dos grupos antes mencionados, se apreció una asociación baja pero significativa con “Más de 20 millones de espermatozoides por ml” con un coeficiente de Rho de 0.531 ($p > 0.01$).

La crianza tradicional de alpacas se suele presentar a la par con la crianza de llama, y a menudo existen cruces entre ambas especies, sumado a esto existe alto nivel de endogamia. Todo lo anterior podrían ser las principales causas de la evolución de alpacas con características indeseables tanto físicas como a nivel de genes reproductivos.

7. CONCLUSIONES

- La ciclina A1 se expresa en testículos de alpacas y existen regiones altamente conservadas a nivel nucleotídico.
- En los animales estudiados (Camal de Huancavelica), la expresión de *CCNA1* a nivel de mRNA presenta una baja correlación pero significativa con la concentración espermática.

8. RECOMENDACIONES

- A partir de la secuencia de mRNA de *CCNA1* de alpaca ensamblada *in silico*, diseñar primers en los extremos 5' y 3' para secuenciar el transcripto completo y así confirmar su secuencia nucleotídica.
- La ciclina A1 debería ser evaluada a nivel inmunoproteico para describir los patrones exactos de expresión testicular usando un anticuerpo contra *CCNA1* de *Bos taurus* (Artiodáctilo) ya que no existe un anticuerpo específico contra *CCNA1* de alpaca.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ax, R.L., Dally, B.A., Didion, R.W., Lenz, C.C., Love, D.D., Hafez, B., Bellini, M.E. **Semen evaluation**. In: **Hafez, E.S.E., Hafez, B. (Eds.), Reproduction in Farm Animals**, 7th Edition. Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia, 2000. pp. 218–236.
- Bassa LI. **Espermatogénesis e infertilidad**. I Congreso ASEBIR, Murcia. Revista Iberoamericana de Fertilidad 2001 (en línea). Disponible en: http://www.editorialmedica.com/archivos/fertilidad/Fert%20Jul_Ag01-Ponen1.pdf.
- Blanco-Rodríguez J. **Keep cyclin or die: The role of germ cell apoptosis in spermatogenesis**. International Society of Andrology 2006. http://www.andrology.org/library/downloads/BR_full.pdf.
- Bloom J, Cross FR. **Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control [review]**. Nature reviews. Molecular cell biology 2007;8(2):149-60.
- Bravo PW, Solis P, Ordoñez C, Alarcon V. **Fertility of the male alpaca: effect of daily consecutive breeding**. Animal Reproduction Science 1997;46(3-4):305-12.
- Brown BW. **A review on reproduction in South American camelids [review]**. Animal reproduction Science 2000;58(3-4):169-95.
- Brunet M. **L'activador de cdk2 Relacionat amb l'apoptosi: Clonatge i estudibioquímic del seu paper regulador de la mort cel·lular programada [Tesis doctoral]**. Barcelona. Universitat Pompeu Fabra; 2006. (en línea) Disponible en: <http://www.tdx.cat/TDX-0122107-173935>.
- CONACS, Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos. **Alpaca (*Lama pacos*). Generalidades**. 2007. (en línea) Disponible en <http://www.conacs.gob.pe/alpaca.htm>.
- Di Berardino D, Nicodemo D, Coppola G, King AW, Ramunno L, Cosenza GF, Iannuzzi L, Di Meo GP, Balmus G, Rubes J. **Cytogenetic**

characterization of alpaca (*Lama pacos*, fam. Camelidae) prometaphase chromosomes. Cytogenetic genome research 2006;115(2):138-44.

- Diederichs S, Baumer N, Ji P, Metzelder SK, Idos GE, Cauvet T, Wang W, Moller M, Pierschalski S, Gromoll J, Schrader MG, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. **Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-CDK2 complex.** Journal of Biological Chemistry 2004;279(32):33727-41.
- Escobar RC. **Mating, parturition.** In: **The Llama, Animal Breeding and Production of South American Camelids.** Ed Hennig R; Talleres Gráficos de ABRIL, Lima, Perú, 1984.
- UCLM (Universidad de Castilla La-Mancha, ES). 2011. Situación Escuela Superior de Informática, Prácticas de Estadística. Correlaciones con SPSS (en línea). Consultado 01 febrero 2011. (en línea) Disponible en:
http://www.uclm.es/profesorado/raulmmartin/Estadistica/PracticasSPSS/CORRELACION_CON_SPSS.pdf.
- FAO, Food and Agriculture Organization. Animal Production and Health Papers - 1. **Animal breeding: selected articles from the World Affirnal Review [review].** FAO Animal Production and Health Papers 1977;133p (en línea). Disponible en:
<http://www.fao.org/DOCREP/004/X6500E/X6500E21.htm#ch21>
- FAO, Producción y Sanidad Animal 2. **Recursos genéticos animales en américa latina.** Roma 1981 (en línea). Disponible en
<http://www.fao.org/docrep/009/ah223s/AH223S10.htm>
- Fernández-Baca S, Hansell W, Novoa C. **Embryonic mortality in alpaca.** Biology of reproduction 1970b;3(2):243-51.
- Fernández-Baca S, Madden DHL, Novoa C. **Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca.** Journal of reproduction and Fertility 1970c;22(2):261-7.

- Fernández-Baca, S. **Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids.** Animal Reproduction Science 1993; 33,307–23.
- Flores P, García-Huidobro J, Muñoz C, Bustos-Obregón E, Urquieta B. **Alpaca semen characteristics previous to mating period.** Animal reproduction science 2002; 72(3-4):259-66.
- Galloway DB. **The development of the testicles in alpacas in Australia.** Proceedings of the Australian Alpaca Industry Conference. Canberra: 2000;21-23.
- Hall TA. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucleic Acids Symposium Series. 1999;41:95-8.
- Humphrey TC, Brooks G. **Methods in molecular biology (vol.296) Cell cycle control: Mechanisms and protocols.** Edit. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005.
- INIA. **Proyecto Camélidos – Población y Producción.** 2006. (en línea) Disponible en <http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0021/PROYECTO%20CAMELIDOS.htm>
- IPBM, **Instituto Peruano de Biología Molecular** (en línea) Disponible en: <http://www.ipbiomol.com/> (Actualmente en condición: “Baja definitiva”.
- Kierszenbaum AL. **Cell-Cycle Regulation and mammalian gametogenesis: A lesson from the unexpected [review].** Molecular Reproduction And Development 2006;73:939-42.
- Lee BT, Tan TW, Ranganathan S. **MGAlignIt: A web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences.** Nucleic Acids Research 2003;31(13):3533-6. (en línea) Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168968/pdf/gkg561.pdf>.
- Lees EM, Harlow E. **Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase.** Molecular and Cellular Biology. 1993;13(2):1194-201.

- Liao C, Wang XY, Wei HQ, Li SQ, Merghoub T, Pandolfi PP, Wolgemuth DJ. **Altered myelopoiesis and the development of acute myeloid leukemia in transgenic mice overexpressing cyclin A1.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001;98(12):6853-8.
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ. **Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse.** Nature Genetics 1998;20:377-80.
- Liu D, Liao C, Wolgemuth DJ. **A role for Cyclin A1 in the activation of MPF and G2-M transition during meiosis of male germ cells in mice.** Developmental Biology 2000;224:388-400.
- Liu J, Kipreos ET. **Evolution of Cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa.** Molecular Biology and Evolution 2000;17(7);1061-1074.
- Lee BTK, Tan TW, Ranganathan S. **MGAlignIt: a web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences.** Nucleic Acids Research, 2003;31(13),3533-3536.
- Lele KM, Wolgemuth DJ. **Distinct regions of the mouse Cyclin A1 gene, *Ccna1*, confer male germ-cell specific expression and enhancer function.** Biology Of Reproduction 2004;71:1340-7.
- Ministerio de Agricultura del Perú. **Camélidos Sudamericanos.** 2008 (en línea) Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/cam%C3%A9lidos-sudamericanos>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. Subsecretaría de Ganadería. **Ganados y Carnes - Anuario 2010.** Buenos Aires. 2011 (en línea). Disponible en: <http://64.76.123.202/site/ganaderia/anuario/pdf/ANUARIO%202010%20COMPLETO%20web.pdf>
- Ministerio de Economía y planificación del Perú. **Reporte anual de la comercialización de auquénidos y sus derivados.** 2004 Vol 1, 37p.

- Mount D.W. **Using th Basic Local Alignment Search Tool (Blast)**. Cold Spring Harb Protoc; 2007; doi:10.1101/pdb.top17 (en línea). Disponible en: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/7/pdb.top17.full#ref-list-1>.
- Mu X, Lee YF, Liu NC, Chen YT, Kim E, Shyr CR, Chang C. **Targeted inactivation of testicular nuclear orphan receptor 4 delays and disrupts late meiotic prophase and subsequent meiotic divisions of spermatogenesis**. Molecular and Cellular Biology 2004; 24(13):5887-99.
- Müller C, Yang R, Beck-von-Preccoz L, Idos G, Verbeek W, Koeffler P. **Clonning of the cyclin A1 genomic structure and characterization of the promoter region**. The Journal Of Biological Chemistry 1999;274(6):11220-8.
- Müller C, Readhead C, Diederichs S, Idos G, Yang R, Tidow N, Serve H, Berdel WE, Koeffler HP. **Methylation of the cyclin a1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent**. Molecular And Cellular Biology 2000;20(9):3316-29.
- Nieduszynski CA, Murria J, Carrington M. **Whole-genome analysis of animal A- and B-type cyclins**. Genome Biology 2002;3(12).
- Noble MEM, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN. **The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control [Review]**. Trends in Biochemical Science. 1997;22(12):482-7.
- Novoa C. **Reproduction on Camelidae**. Journal of reproduction and fertility 1970;22(1):3-20.
- Nugent JH, Alfa CE, Young T y Hyams JS. **Conserved structural motifs in cyclin identified by sequence analysis**. Journal of Cell Science. 1991;99(Pt 3):669-74.
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. **Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice**. Nature Genetics 2003;35(1):25-31.

- Pacheco C, Joel I. **Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos**. REDVET, Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. 2008;Vol IX(4).
- Quispe TL. **Sistemas de empadre en alpaca**. Revista argentina de producción animal 1996;16:357-61.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM. **Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data**. Neuroscience Letters 2003;339:62-6.
- Ravnik SE, Wolgemuth DJ. **Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage**. Developmental Biology 1999;207:408-18.
- Rodríguez JB, Wheeler JC, Dodd CS, Bruford MW, Rosadio RA. **Determinación de parentesco en alpacas (*Lama pacos*) por medio del análisis de DNA microsatélite**. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 2004;15(2):113-9.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. **Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data**. Nucleic Acids Research 2009.37(6):e45.
- Salazar G, Joshi A, Liu D, Wei H, Persson JL, Wolgemuth DJ. **Induction of apoptosis involving multiple pathways is a primary response to Cyclin A1-deficiency in male meiosis**. Developmental Dynamics 2005;234:114-123.
- Schrader M, Müller-Tildow C, Ravnik S, Müller M, Schulze W, Diederichs S, Serve H, Miller K. **Cyclin A1 and gametogenesis in fertile and infertile patients: a potential new molecular diagnostic marker**. Human Reproduction 2002a;17(9):2338-43.
- Schrader M, Ravnik S, Miller-Tidow, C, Miller, M., Straub, B., and Miller, K. **Quantification of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Cyclin A1 expression in testicular biopsies of infertile**

patients by fluorescence Real-Time RT-PCR. International Journal of Andrology 2002b;25:202-209.

- Smith CL, Peter AT, Pugh DG. **Reproduction in llamas and alpacas: a review.** Theriogenology 1994, 41: 573-596.
- Sumar, J. **Studies of reproductive pathology in alpacas.** MSc. Tesis. Faculty of Veterinary Medicine. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 1983.
- Sweeney C, Murphy M, Kubelka M, Ravnik SE, Hawkins CF, Wolgemuth DJ, Carrington M. **A Distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse.** Development 1996;122:53-64.
- Tataje L.A. **Análisis *in silico* de los genes que codifican para las ciclinas tipo A, B, D y E, y determinación de su evolución molecular en eucarionte.** Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. 2010.
- Van der Meer T, Chan WY, Palazon LS, Nieduszynski C, Murphy M, Sobczak-Thepot J, Carrington M, Colledge WH. **Cyclin A1 protein shows haplo-insufficiency for normal fertility in male mice.** Reproduction 2004;127(4):503-11.
- WHO. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.** 2010 (en línea). Disponible en: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/index.html>).
- Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM. **Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line.** Recent Progress In Hormone Research 2002;57:75-101.
- Wolgemuth DJ, Lele KM, Jobanputra V, Salazar G. **The A-type Cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells [review].** International Journal Of Andrology 2004;27:192-9.
- Yang R, Morosetti R, Koeffler HP. **Characterization of a second human Cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines.** Cancer Research 1997;57(5):913-920.

- Zuker M. Mfold web server for nucleic folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research 2003;31(13):3406-15.

10. ANEXOS

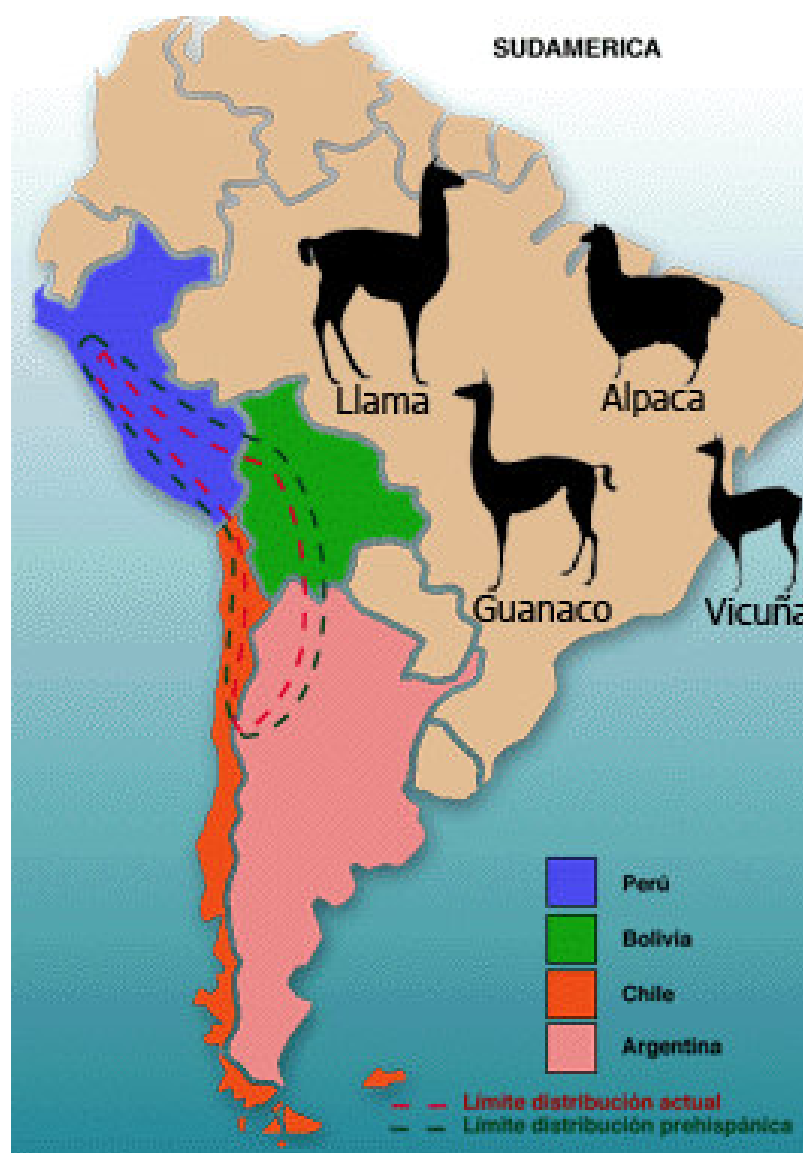
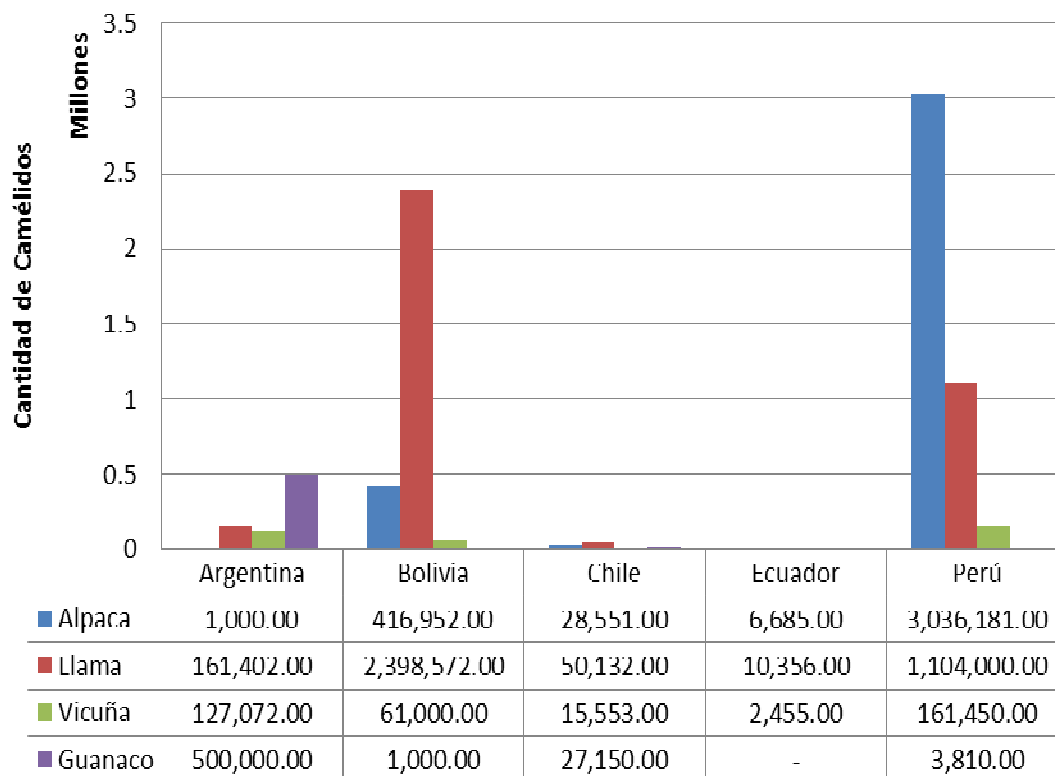


Figura 01. Hábitat de los CSA (llama, alpaca, guanaco y vicuña).

Las líneas punteadas rojas indican el límite de distribución actual de los CSA, y las líneas punteadas negras muestran la distribución prehispánica de los CSA. Fuente: Imagen modificada de http://www7.uc.cl/sw_educ/prodanim/notrad/siv4.htm

Tabla 01. Población de Camélidos por país de Sur América

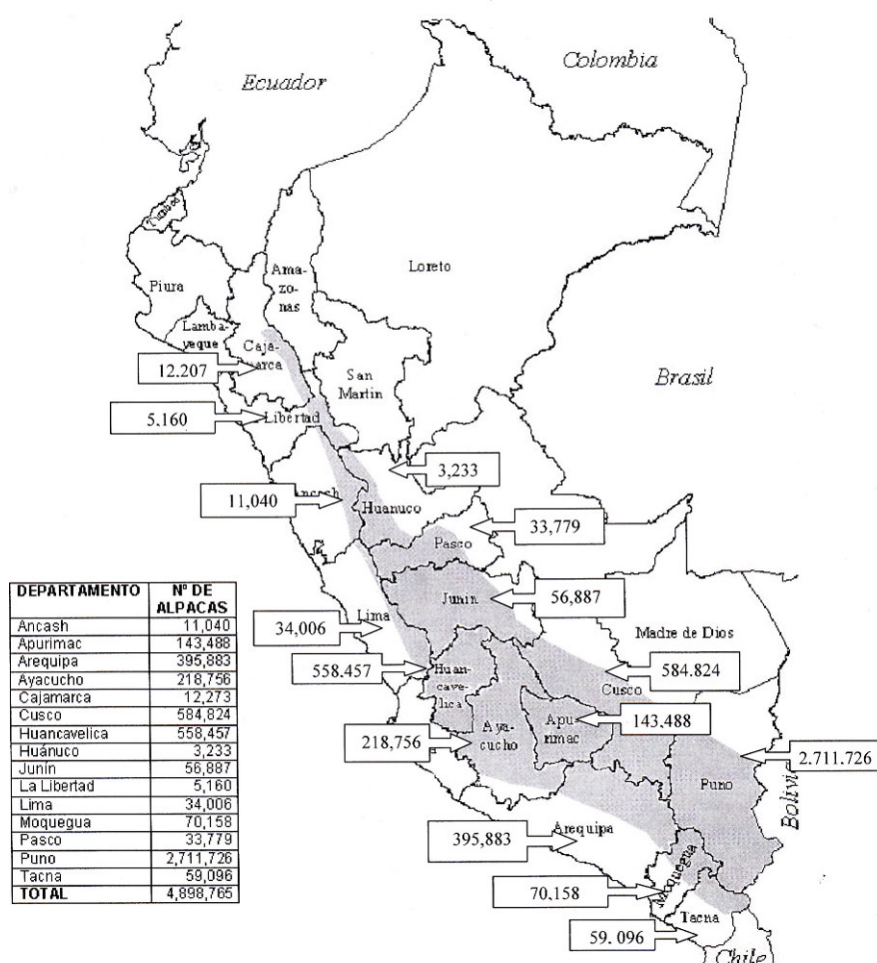
Existencia de camélidos en Sur América



Fuente: La tabla fue confeccionada en base a datos publicados en Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (Argentina), 2011. Se muestra la distribución de camélidos en Sur América por país.

Mapa N° 1: POBLACION DE ALPACAS EN EL PERU

Fuente: Ministerio de Agricultura – Elaboración IPAC



Fuente: Ministerio de Agricultura – Elaboración del IPAC

Figura 02. Población de alpacas en el Perú. Se muestra la distribución del ganado alpaquero a lo largo del territorio peruano. Fuente: Imagen obtenida de:

<http://www.alpacadelperu.pe/includes/FCKeditor/upload/Image/2012/diciembre/Mapa%20poblacion%20de%20Alpacas%20en%20Peru.jpg>

Tabla 02. Producción de fibra, carne, saca de animales y rendimiento de carcasa de camélidos domésticos.

Parámetros	Alpacas	Llamas
Producción de fibra	3,399.00 t	760.00 t
Producción de carne	8,271.00 t	3,209.00 t
Producción de fibra / cabeza	1.5-2.8 kg	1.5-3.5 kg
Producción de carne / cabeza	33 kg	51 kg
Saca de animales	315,910.00	107,069.00
Peso vivo promedio	50 kg	120 kg
Rendimiento de carcasa	55%	60%

Fuente: INIA, 2006.

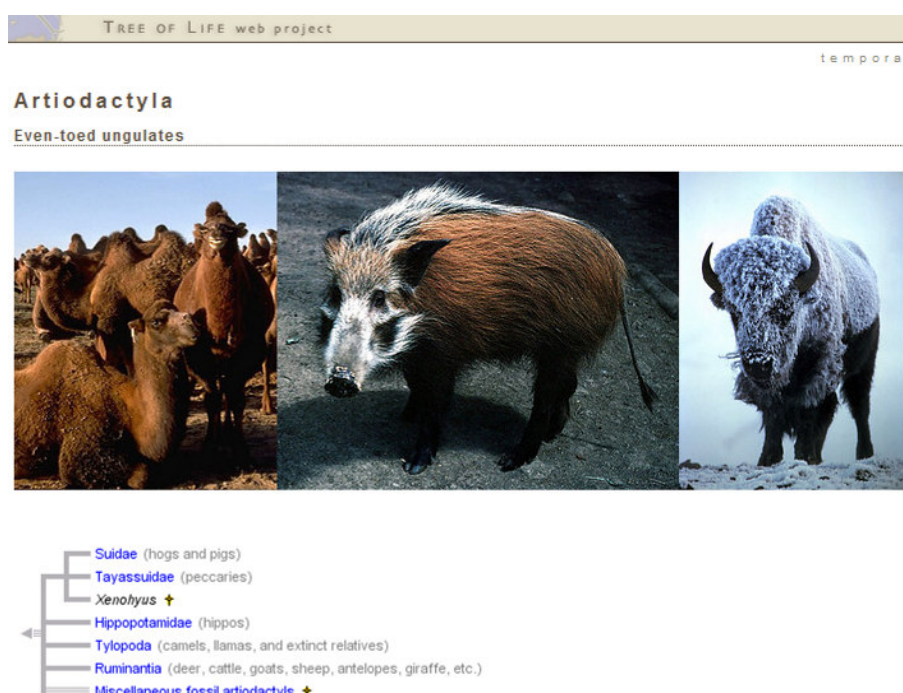


Figura 03. Orden Artiodáctilo incluye también a porcinos, venados, vacunos, cabras, ovejas, hipopótamos, camellos, camélidos. Fuente: Tree of Life (<http://tolweb.org/Artiodactyla/15976>)

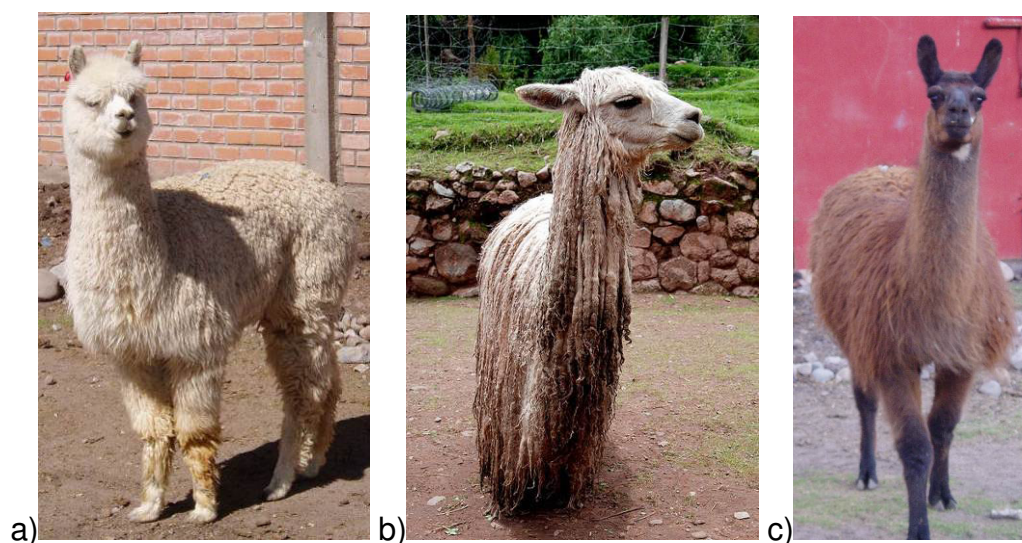


Figura 04. Diferencias fenotípicas entre alpaca huacaya y alpaca suri con llama. A la izquierda a) Alpaca huacaya (fotografía del proyecto), al medio b) Alpaca Suri (Fuente: <http://www.flickr.com/photos/textexin/3183079381>) y a la derecha c) Llama (fotografía del proyecto).